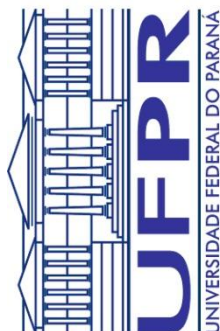
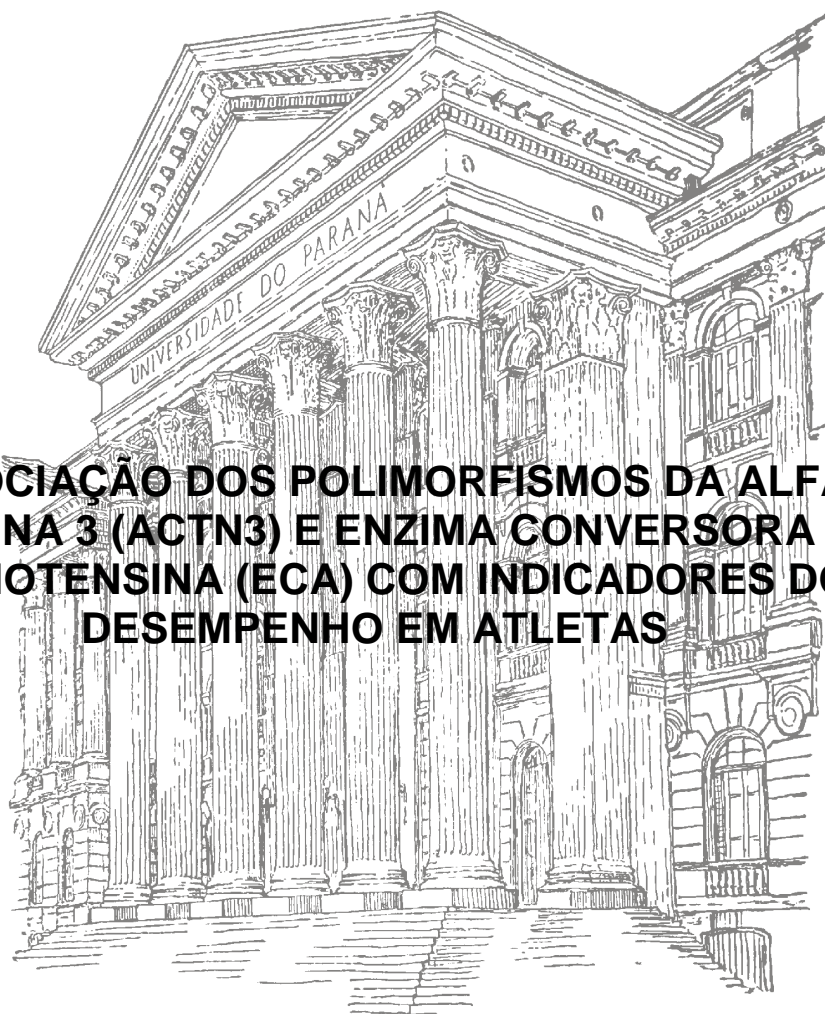


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EDUCAÇÃO FÍSICA

LARISSA BOBROFF DAROS

**ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DA ALFA-
ACTININA 3 (ACTN3) E ENZIMA CONVERSORA DA
ANGIOTENSINA (ECA) COM INDICADORES DO
DESEMPENHO EM ATLETAS**



**CURITIBA
2014**

LARISSA BOBROFF DAROS

**ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DA ALFA-
ACTININA 3 (ACTN3) E ENZIMA CONVERSORA DA
ANGIOTENSINA (ECA) COM INDICADORES DO
DESEMPENHO EM ATLETAS**

Tese apresentada como pré-requisito para a
obtenção do título de Doutora em Educação
Física, no Departamento de Educação Física,
Setor de Ciências Biológicas da Universidade
Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Raul Osiecki

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE EDUCAÇÃO FÍSICA

Daros, Larissa Bobroff.

Associação dos polimorfismos da alfa actnina 3 (ACTN3) e da enzima conversora da angiotensina (ECA) com indicadores de desempenho em atletas. / Larissa Bobroff Daros - Curitiba, 2014. 95 f : il. (color.); 29cm

Inclui bibliografia

Orientador: Raul Osiecki.

Tese (Doutorado em Educação Física) - Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná.

1. Genética humana. 2. Genótipos. 3. Desempenho físico. 4. Polimorfismo. I. Título.

**573.21
D224**

**ADALIR DE FATIMA PEREIRA
BIBLIOTECÁRIA**



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Educação Física

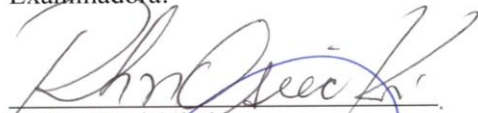


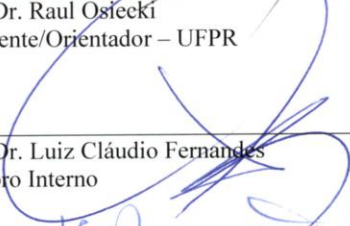
TERMO DE APROVAÇÃO


LARISSA BOBROFF DAROS

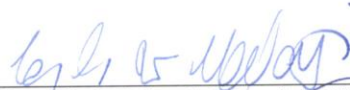
“Associação dos Polimorfismos da Alfa-Actinina 3 (ACTN3) e Enzima Conversora da Angiotensina (ECA) com indicadores da performance em atletas”

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Educação Física – Área de Concentração: Exercício e Esporte; Linha de Pesquisa: Desempenho Esportivo; do Programa de Pós-Graduação em Educação Física do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte Banca Examinadora:


Prof. Dr. Raul Osiecki
Presidente/Orientador – UFPR


Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes
Membro Interno


Prof. Dr. Julio Cesar Bassan
Membro Externo


Prof. Dr. Carlos Ricardo Maneck Malfatti
Membro Externo


Prof. Dr. Luiz Cláudio Recheberg Stanganelli
Membro Externo

Curitiba, 28 de Março de 2014.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao meu orientador Prof. Dr. Raul Osiecki pela orientação e amizade tão importante em todos os momentos do doutoramento.

À Secretaria de Estado do Esporte e Turismo do Paraná, em especial na pessoa do Secretário e também Professor, Dr. Evandro Rogério Roman, pelo crédito e confiança na proposta de estudo e pela disponibilidade dos atletas vinculados ao programa de Estado Talento Olímpico do Paraná 2016.

Aos atletas participantes do estudo que tanto se empenharam e se dedicaram aos testes físicos e a coleta sanguínea.

Aos técnicos que disponibilizaram seus atletas acreditando na evolução da pesquisa em esporte e na melhoria do entendimento do desempenho atlético por meio de testes físicos e genéticos.

Aos estagiários, hoje profissionais da área, do laboratório de pesquisa em estudos de Ciências do Esporte da Universidade Estadual de Londrina, sem eles não seria possível a coleta de dados. Os estagiários são: Julia Durigan, Bruna Seron, Lucélia Almeida, Loani Istchuk, Vinicius Carvalho, Mauricio Ramos, Leonardo Nascimento, Gabriel Razl, Lucas Martins, Oriane Martins, Fernando Matzenbacher, Danylo Rodrigues, Franciele Ribeiro, Danilo Koiti.

Ao professor e amigo de sempre Dr. Luiz Claudio Reeberg Stanganélli, responsável pelo laboratório da UEL e que me disponibilizou tudo o que era necessário para a coleta de dados.

Aos professores Dr. Mario Sergio Mantovani e Dra. Daniele Sartori por todo apoio, ajuda e companheirismo nas análises do DNA, sem a colaboração e parceria de vocês esse trabalho não teria como ser concluído.

Aos colegas de departamento na UNICENTRO que me substituíram durante os 4 anos de licença e sempre me deram todo o apoio necessário para manter minha licença, são eles: Schelyne Ribas da Silva, Marcos Roberto Queiroga, Silvano da Silva Coutinho, Deoclécio Rocco Gruppi, Itamar Adriano Tagliari, José Ronaldo Fassheber, Marcus Tartaruga e Bruno Portela.

A grande amiga, incentivadora, colega de doutorado a quem agradeço de coração todas as horas de angustia e alegria que passou comigo, Ana Claudia Vecchi Osiecki.

As amigas de Curitiba que tive o prazer em conhecê-las durante minha estadia de 4 anos na cidade, Maristela Cantu e Rossana Bittencourt, nos divertimos e rimos muito.

Aos colegas do laboratório CEPEFIS Fabiano Salgueirosa, Elton Bonfim, Edinaldo Oliveira, Renata Wassmandorf, Paula Tamburi Borges, Vitor Nascimento, Patrick Rodrigues e Luciana Timossi, sempre juntos durante boa parte do doutoramento.

A minha família, meu pai Islam Daros, meus irmãos e cunhados (a), Alexey e Ana, Pollyanna e Roberto, Tatianna e Dante, e minhas sobrinhas Ana Flavia, Ana Julia e Anna Clara, pela paciência e compreensão nos momentos mais tensos, sempre me apoiando e torcendo para dar tudo certo.

A minha mãe, que com certeza onde estiver, está me guiando e me zelando nos momentos difíceis e se divertindo comigo nos momentos mais alegres.

Aos amigos em geral que de forma direta ou indireta contribuíram para o estudo.

E por último, mas muitíssimo especial, por todo o apoio de sempre, compreensão, broncas, brigas e elogios, todo o trabalho é dedicado a você, o meu maior incentivador desse título há quase 17 anos, meu marido Antonio Carlos Dourado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Objetivos	17
1.1.1 Objetivo Geral	17
1.1.2 Objetivo Específico	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 DNA Como Regulador do Funcionamento do Organismo	18
2.2 Genéticas, Fenótipos Musculares e Atividade Física	20
2.3 Estrutura e Funcionamento da α – Actinina 3	23
2.4 Fenótipos Esportivos e Alfa-Actinina 3	26
2.5 Estrutura e Funcionamento da Enzima Conversora da Angiotensina (Eca I/D)	30
2.6 Polimorfismo Ace I/D e Performance Física	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 POPULAÇÃO E AMOSTRA	38
3.2 GENÉTICA	40
3.2.1 Extração e quantificação do DNA do sangue periférico	40
3.2.2 Genotipagem do Polimorfismo R577X do gene da <i>alfa-actinina 3</i> (ACTN3)	42
3.2.3 Genotipagem do Polimorfismo (I/D) do gene da enzima conversora de angiotensina ECA	45
3.3 AVALIAÇÕES FÍSICAS E DE PERFORMANCE ESPORTIVA	46
3.3.1 Avaliação da Composição Corporal	46
3.3.2 Teste em Esteira Rolante (Ergoespirometria)	47
3.3.3 Avaliação de Potência de Membros Inferiores	50

3.3.4 Avaliação da Velocidade	52
3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICA	52
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5. CONCLUSÕES	73
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
7. ANEXOS	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Arquitetura do disco Z	14
Figura 2 - Frequências dos três genótipos ACTN3 R577X nos controles e atletas de elite	19
Figura 3 - Distribuição de fibras (vasto lateral) de um indivíduo II e um DD	22
Figura 4: Retirada do <i>Pellet</i> . Início da extração do DNA.	33
Figura 5: Equipamento da análise da ACTN3 (termociclador CFX96 Bio-Rad), com amostra.	35
Figura 6: Plestimografia da marca COSMED, BOD POD <i>Gold Standart</i> — Body Composition System Tracking System.	38
Figura 7: Teste de Esteira Rolante utilizando o analisador de gases portátil K4b2 (COSMED).	41
Figura 8: Salto <i>Squat Jump</i> em Plataforma.	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Modalidades, gênero e categoria de bolsa	30
Tabela 2 - Duração de evento, gênero e categoria de bolsa	31
Tabela 3 – Características descritivas dos sujeitos da amostra (Geral)	45
Tabela 4 – Características descritivas da amostra separadas por gênero.	46
Tabela 5 – Frequência genotípica do ACTN3 e da ECA em relação à distribuição por esporte (Geral).	48
Tabela 6 - Frequência genotípica masculina e feminina do ACTN3 e da ECA em relação à distribuição por esporte.	51
Tabela 7 – Característica descritiva da amostra categorizada por nível de desempenho.	53
Tabela 8 – Frequência genotípica do ACTN3 e da ECA categorizados por nível de desempenho.	54
Tabela 9 - Frequência genotípica geral do ACTN3 e da ECA em relação à distribuição por duração do esforço.	55
Tabela 10 – Frequência genotípica masculina e feminina do ACTN3 e da ECA em relação à distribuição por duração do esforço.	57
Tabela 11 – Associação do genótipo ACTN3 com as variáveis do desempenho motor.	61
Tabela 12 – Associação do genótipo ECA com as variáveis do desempenho motor.	65

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTN – Alfa Actinina

ACTN3 – Alfa Actinina 3

ECA – Enzima Conversora da Angiotensina

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

PBMC – Células mononucleares do sangue periférico

MHC – Cadeia Pesada da Miosina

VO_{2máx} – Consumo máximo de Oxigênio

SJ – *Squat Jump*

CMJ – *Counter movement Jump*

SCMJ – *Counter movement Jump com auxílio dos membros superiores*

cm – Centímetros

Kg - Kilogramas

Seg – Segundos

% - Percentual

TOP 2016 – Programa de Talento Olímpico do Paraná 2016 (Secretaria de Estado de Esporte e Turismo do Paraná)

RESUMO

O objetivo do estudo foi identificar a existência da associação dos polimorfismos dos genes da ACTN3 (R577X) e ECA I/D com indicadores do desempenho de atletas classificados de acordo com a duração do esforço (“endurance”, potência/velocidade e mista). A amostra foi composta de 176 atletas (Masculino n=100 e Feminino n=76) com média de idade de 16,75anos \pm 3,50, relacionados a 22 modalidades esportivas do Estado do Paraná. Todos os atletas foram selecionados como os melhores atletas do Estado do Paraná em suas modalidades específicas de acordo com cada Federação. A amostra de DNA foi retirada de 4ml de sangue por meio da veia antecubital. A genotipagem do polimorfismo R577X do gene *ACTN3* foi realizada com o uso de sonda do tipo TaqMan, ID rs1815739 (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA). A genotipagem do polimorfismo da ECA I/D foi realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR), sendo que a visualização ocorreu por meio da eletroforese. Os testes físicos realizados foram saltos verticais (*Squat Jump*, *Counter movement Jump* e *Counter movement Jump* com auxílio dos membros superiores, cm e watts), velocidade de 30m (seg) e Consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}). Para análise estatística utilizou-se do teste Qui-quadrado e Anova One Way, com valor de $p<0,05$. Não foi encontrada associação entre os genótipos estudados e a duração do esforço (ACTN3 vs Duração do Esforço, $p=0.709$; ECA VS Duração do Esforço, $p=0.140$), mas encontrou-se prevalência do gene RX e DI para as durações de esforço (resistência: RX=60,6%, DI=46,87%.; Potência/velocidade: RX=54,1%, DI=50%; Mista: RX=45%, DI=41,98%). Pode-se concluir que não houve associação entre os polimorfismos da ACTN3 e ECA em relação à duração do esforço e ao desempenho físico, apresentando uma prevalência para os genes heterozigotos em todas as durações de esforço.

Palavras Chaves: Polimorfismos, genótipos, desempenho físico.

ABSTRACT

The aim of this study was to identify the association between ACTN3 (R577X) and ACE (I/D) gene polymorphisms and athletic performance type (endurance, speed/power and mixed). The sample consisted of 176 athletes (100 men and 76 women) with mean age of 16.75 years \pm 3.50. We studied 22 sports; all athletes were chosen from the best in their respective Federations of the State of Paraná. DNA samples were withdrawn from 4ml of blood from the median cubital vein. Genotyping of the ACTN3 – R577X gene polymorphism were performed using a TaqMan probe ID rs1815739 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Genotyping of the ACE I / D polymorphism were performed by polymerase chain reaction (PCR), followed by visualization by electrophoresis. The physical tests were vertical jumps (Squat Jump, Jump and Countermovement Jump with help of the arms), speed in the 30m sprint (in seconds) and maximum oxygen consumption (VO_{2max}). Statistical analysis was done with the chi-square test and One Way ANOVA , with significance at $p < 0.05$. Genotypes were not statistically significant with the duration of effort (ACTN3 vs Duration of Effort, $p = 0.709$; ACE VS Length of Effort, $p = 0.140$). The prevalence of RX and DI genes were more prevalent in the duration of effort (resistance : RX = 60.6 % , DI = 4.87 % , Power / Speed : . RX = 54.1 % , DI = 50 % ; Mixed: RX = 45 % , DI = 41.98 %). We therefore conclude that genetic variables show a prevalence that can help in determining the choice of a sport / event that requires a specific type of metabolism to exercise in young athletes, although there was no association between polymorphisms ACTN3 and ACE in relation to exercise duration and physical performance.

Key Words: polymorphisms, genotypes, physical performance.

1. INTRODUÇÃO

O tema treinamento esportivo é muito abrangente e pode até ser confundido com a grande área Esporte, pois ambos possuem objeto de estudo em comum: o desempenho esportivo. Atualmente, o desempenho esportivo pode ser visto como sistema cujas propriedades, interagem o tempo todo, ou seja, quando uma propriedade é alterada, todas as outras são influenciadas (Dias, 2011). Essas propriedades podem ser ditas como: Técnica – biomecânica e aprendizagem motora; Tática – cognição e ação; Condições Físicas – biomecânica, aprendizagem motora, controle motor, fisiologia e cineantropometria; Nutrição; Psicologia – psicologia emocional; Social – sociologia; Genética – biologia genética e sociologia ambiente.

O objeto desse estudo está relacionado com o desempenho esportivo cuja propriedade é a Genética (biologia genética), mais precisamente a associação entre o desempenho esportivo em atletas, a α – actinina 3 (ACTN3) e a Enzima Conversora da Angiotensina (ECA). Apesar dos fatores ambientais terem grande importância na determinação do desempenho esportivo, atualmente se reconhece que fatores genéticos são responsáveis por grande parte das variações do desempenho esportivo (BRAY et al., 2009; STEWART & RITTWEGGER, 2006; WOLFARTH et al., 2005; CARMELLI & REED, 2000; LOOS et al., 1997; THOMIS et al., 1997; MAES et al., 1996).

Alterações nas sequências de bases do DNA (polimorfismos) pode influenciar na expressão e atividades de determinadas proteínas e, assim, estar envolvida na variação do fenótipo de desempenho físico. Hoje, acredita-se que aproximadamente 300 variações genéticas (genes candidatos) estão relacionados com fenótipos de desempenho e aptidão física e saúde (Dias, 2011; Bray, Hagberg et al., 2009; Sharp, 2008), dentre os quais destacam-se o gene da ACTN3 que codifica a α -actinina 3 e a ECA que codifica a Enzima Conversora da Angiotensina, sendo este o primeiro a ser associado com a desempenho físico humano (MA, YANG, et al., 2013; PUTHUCHEARY, SKIPWOORTH, et al., 2011; MONTGOMERY, MARSHALL et al., 1998).

De acordo com as variáveis estudadas a herdabilidade pode explicar de 44% a 66% das variações interindividuais no desempenho esportivo, sendo a influência dos fatores genéticos maior em jovens do que em idosos (MA, YANG, et al., 2013;

Tiainen et al., 2009; Prior et al., 2007; Stewart & Rittweger, 2006; Beunen & Thomis, 2004; Beunen & Thomis, 2000). O conceito que os traços genéticos estão fortemente associados com o desempenho físico humano tem sido amplamente aceito na última década. Os pesquisadores estão agora se concentrando em procurar os perfis genéticos que contribuem para o esporte de desempenho e determinar os mecanismos subjacentes envolvidos em campos específicos do desempenho atlético (MA, YANG, et al., 2013, Perusse, L., Rankinen, T., et al 2013, Roth, S.M., Rankinen, T., et al 2012, Rankinen, T., Roth, S.M., et al 2011). Portanto, dois dos fatores genéticos que podem ter influência no desempenho esportivo é o polimorfismo no gene da alfa-actinina-3 (ACTN3) e a Enzima Conversora da Angiotensina (ECA) (TUCKER, R., CONCEJERO-SANTOS, J. and COLLINS, M. 2013; WANG, G., MIKAMI, E., CHIU, L., et al 2013; KIKUCHI, N., MIN, S., UEDA, D., et al 2012; CLARKSON et al., 2005; NIEMI & MAJAMAA, 2005; YANG et al., 2003; MONTGOMERY, MARSHALL et al., 1998)

As alfa-actininas (ACTN), são uma família de proteínas relacionadas à distrofina que se ligam à actina, e são importantes para a ligação e fixação dos miofilamentos (Puthuchery, Z., Skipworth, J.R.A., Rawal, j., et al 2011; MacArthur, D. G. and North, K.N., 2011; McCauley, T., Mantana, S.S., Folland, J.P. 2010; Mills et al., 2001; North e Beggs, 1996). Quatro genes para a ACTN foram encontrados em humanos: ACTN1, ACTN2, ACTN3 e ACTN4. As ACTN1 e 4 não são proteínas musculares (Kaplan et al, 2000), enquanto que ACTN2 e ACTN3 são proteínas miofibrilares localizados no disco Z. ACTN2 e ACTN3 são altamente conservadas através da evolução, e ACTN3 é isoforma específica de contração rápida, expressa apenas nas fibras tipo II (MACARTHUR, D. G. and NORTH, K.N., 2011; BEGGS et al., 2000; MILLS et al., 2001; NORTH et al., 1999).

Estudos têm demonstrado que o polimorfismo R577X está associado com a desempenho muscular humano. O genótipo nulo 577XX é nitidamente pouco representado em atletas de elite em provas e esportes com predominância em velocidade e potência, e também tem sido associada com a redução da força muscular e desempenho em velocidade em amostras de não-atletas (Moran et al., 2007; Vicent et al., 2007; Clarkson et al., 2005), sugerindo que a deficiência da ACTN3 tem efeito prejudicial sobre a função das fibras musculares esqueléticas de contração rápida. North, Yang et al. (1999) descreveram pela primeira vez um

polimorfismo que causa transversão (C-T) no exon 16 no gene ACTN3, convertendo um resíduo da arginina (R) para um códon de parada (X) na posição 577, levando a deficiência na produção da α -actinina 3. Aproximadamente 16% da população é completamente deficiente desta proteína devido a homozigotidade do códon de parada R577X (Berman e North, 2010). Em relação ao esporte a deficiência da ACTN3 (XX) pode melhorar a desempenho de “endurance” (MacArthur et al., 2008).

Em relação ao gene que codifica a ECA (I/D), este apresenta um polimorfismo que consiste na ausência (deleção, D) ou presença (inserção, I) de 287 pares de base no íntron 16 (Zilberman – Schapira, G., Chen, J. and Gerstein, M. 2012; Rigat, Hubert et al., 1990). O alelo D está associado á maior atividade da ECA tanto no plasma, quanto nos tecidos (Puthuchery, Skipworth et al., 2011), assim, homozigóticos para o alelo D (Genótipo DD) apresentam maior atividade da ECA quando comparados com genótipos ID e II. O fato de existirem sistemas renina-angiotensina locais em tecidos como o adiposo, muscular cardíaco e esquelético sugere que a expressão e atividade da angiotensina II pode influenciar em fenótipos de desempenho físico.

O alelo I parece estar relacionados com eventos de endurance, mostrando maior frequência em montanhistas (Montgomery, Marshall et al., 1998), remadores (Gayagay et al., 1998), triatletas (Collins, Xenophontos et al., 2004, Shenoy, Tandon et al., 2010) e corredores de fundo de nível olímpico (Myerson, Hemingway et al., 1999). Está associado também com o maior percentual de fibras tipo I (Zhang, Tanaka et al., 2003) e maior consumo de oxigênio (VO_{2max}) (Almeida, Boullosa et al., 2012). Por outro lado, o alelo D tem demonstrado relação com eventos de força/potência, apresentando maior frequência em nadadores de curta distância (Woods, Hickman et al., 2001, Costa, Silva et al., 2009) e atletas de eventos de curta duração de modalidades variadas (Nazarov, Woods et al., 2001), além de estar ligado a maior percentual de fibras do tipo IIb (Zhang, Tanaka et al., 2003).

Sabe-se que o perfil poligênico ótimo depende de combinação de vários genes. Contudo, o presente estudo pretende contribuir com o entendimento do tema ao analisar conjuntamente o possível efeito de duas variantes genéticas que têm se mostrado importantes na determinação do fenótipo de desempenho física. Os resultados podem auxiliar os profissionais que trabalham com vários esportes e várias categorias no esporte de rendimento no encaminhamento desses atletas na

modalidade e prova específica de acordo com seu perfil genético e indicadores físicos de cada atleta.

É conhecido que a ACTN3 e ECA possuem relação com eventos de curta duração (RR e RX, DD e DI, respectivamente ACTN3 e ECA) e longa duração (XX, II, respectivamente ACTN3 e ECA). Portanto, levanta-se a seguinte questão de pesquisa: Qual a distribuição genotípica da ACTN3 (XX, RX e RR) e da ECA (DD, DI, II) e a associação com o desempenho em atletas de diferentes modalidades?

O exercício pode ser uma variável a ser controlada nas pesquisas sobre os efeitos genéticos em determinados fenótipos, como por exemplo, capacidade cardiorrespiratória, “endurance”, força e potência muscular. Outra forma de se analisar a interação entre fatores genéticos e ambientais é comparar a diferença de resposta entre determinados genótipos, pois a resposta ao exercício é altamente variável entre os indivíduos, o que também pode ser mediado por variações genéticas (Bray, 2000). Portanto, além de influenciar diretamente nos fenótipos musculares, se reconhece que os fatores genéticos podem interferir na resposta ao treinamento (Pimenta, 2012; Thomis *et al.*, 1998; Beunen & Thomis, 2004; Thomis *et al.*, 2004; Brutsaert & Parra, 2006).

Apesar de ser reconhecido que os ganhos de força e massa muscular em função de um programa de exercício modificam a expressão gênica, a determinação de genes específicos associados a esse processo ainda não é precisa (GENTIL, 2010). A identificação de genes associados aos fenótipos musculares (capacidade cardiorrespiratória, “endurance”, força e potência muscular) possibilitaria identificar os indivíduos com determinados padrões de resposta e, sendo assim, o conhecimento científico deste estudo permitirá estabelecer intervenções mais eficientes, inclusive com possibilidades de direcionar práticas específicas para determinados grupos de acordo com sua sensibilidade ao treinamento.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GERAL

Identificar a existência e suas associações dos polimorfismos dos genes da ACTN3 (R577X) e ECA I/D com indicadores do desempenho de atletas classificados de acordo com a duração do esforço

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar a frequência genotípica dos polimorfismos da ACTN3 (R577X) e ECA I/D em atletas classificados de acordo com a duração do esforço e gênero.

Verificar a associação entre os polimorfismos ACTN3 e ECA I/D com o desempenho motor de atletas em testes motores.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DNA COMO REGULADOR DO FUNCIONAMENTO DO ORGANISMO

Antes de discutir a relação do esporte de alto rendimento com a biologia molecular, é importante relembrar alguns conceitos, concordando com Bueno Jr. e Pereira (2010). O primeiro deles é o chamado dogma central da biologia molecular, segundo o qual o código da vida está contido no DNA e por meio dele é transmitido às diferentes gerações. Inicialmente ocorre a transcrição, processo no qual o código do DNA é transmitido ao RNA mensageiro. A seguir, pelo fenômeno conhecido como tradução, as moléculas de RNA mensageiro são lidas, fornecendo a informação da ordem na qual os aminoácidos serão integrados para formar as proteínas no citoplasma das células, tendo os ribossomos como organelas fundamentais nesse processo. Finalmente, por meio de fosforilação, nitrosilação e glicosilação, ocorrem ajustes finos nas proteínas, que, além de fazerem parte da estrutura do organismo, participam de uma série de processos cruciais ao ser vivo, como: degradação de substratos metabólicos; geração de energia; síntese proteica; recepção do sinal de hormônios e de neurotransmissores; transporte de substâncias por meio de canais na membrana das células; geração de tensão nas células musculares; e regulação da duplicação e da morte celular programada. Portanto, qualquer alteração nos processos de transcrição e/ou tradução pode alterar a quantidade e/ou a qualidade das proteínas no organismo e, conseqüentemente, alterar seu funcionamento, inclusive quando o organismo é submetido ao esporte de alto rendimento (Alberts et al., 2007.)

No DNA, toda informação é armazenada com auxílio de diferentes combinações dos quatro nucleotídeos – citosina, guanina, adenina e timina. As informações contidas nas sequências nucleotídicas capacitam após os processos de transcrição e/ou tradução, a formação de produtos funcionais - RNA funcional e/ou proteína. Até o momento em humanos foram identificados cerca de 30 mil genes, distribuídos nos 46 cromossomos contidos no núcleo de cada célula somática (Wolfarth et al, 2005).

A identificação da estrutura do ácido desoxirribonucléico (DNA), por James Watson e Francis Crick, em 1953, e o rápido avanço das técnicas de biologia molecular tornaram possível a identificação de seqüências variantes no DNA de

genes específicos, relacionando tal heterogeneidade gênica a diferentes fenótipos (Wolfarth et al, 2005).

O DNA humano contém aproximadamente 3,1 bilhões de pares de bases (A – adenina; G – guanina; C – citosina; T – timina) divididos em aproximadamente 30 mil genes. Depois de transcrita, a sequência de nucleotídeos de cada gene é traduzida em uma sequência polipeptídica, dando origem a uma proteína específica. O genoma humano contém quase 10 milhões de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs – *single nucleotide polymorphisms*) (Rankin et al 2010). O Polimorfismo é descrito como alterações na sequência de DNA que modificam a função ou a expressão de uma proteína, ocorrendo na população com frequência igual ou superior a 1%. No entanto, nem todos os SNPs são reconhecidos como funcionais, ou seja, nem todos têm potencial em afetar a expressão de um gene ou a função da proteína codificada por um gene mutante. Sendo assim, dentre as quase 10 milhões de variantes genéticas existentes, apenas uma parcela delas poderia influenciar um fenótipo específico (Rebbeck et al, 2004).

Apesar de cerca de 99,9% da sequência do DNA ser igual entre quaisquer seres humanos, a variação restante é responsável pela determinação de parte de nossas características físicas, nossas habilidades e até mesmo nossas respostas a tratamentos farmacológicos e à prática de exercícios físicos (Alberts et al., 2007).

As diferenças genéticas entre os indivíduos podem ter duas aplicações no esporte de alto rendimento, segundo Bueno Jr. e Pereira (2010):

1. *Pré-seleção e seleção de talentos esportivos*: o princípio desse processo é o seqüenciamento dos nucleotídeos do DNA de embriões (pré-seleção) ou de indivíduos (seleção) visando buscar indicadores genéticos compatíveis com as características da modalidade esportiva de interesse. Como será discutida posteriormente, a ACTN3 com a variação RR e RX, por exemplo, está correlacionada com melhor desempenho em modalidades que dependem da capacidade relacionada com velocidade e potência, enquanto que a ausência de ACTN3 que é determinada pela variação XX está melhor relacionada com as atividades de “endurance”.

Até o momento não foi divulgada a pré-seleção de embriões com fins esportivos, apesar de a técnica já ser eficientemente utilizada com o objetivo de evitar certas doenças, como as distrofias musculares. A seleção de talentos

esportivos por meio do seqüenciamento gênico, no entanto, já é utilizada em alguns dos principais centros esportivos de excelência do mundo. É importante ressaltar que a aptidão para determinada modalidade tem relação com uma série de características e, conseqüentemente, vários genes. Além disso, é fundamental considerar que esta é uma área recente na pesquisa científica e novos resultados podem-se mostrar controversos em relação aos anteriores (Thompson and Binder-Macleod, 2006; Papadimitriou et al., 2009; Kim et al., 2010; Woods, 2009).

2. *Prescrição do treinamento*: o princípio desse processo é determinar, também por meio do seqüenciamento gênico, qual tipo de treinamento seria mais adequado para cada atleta, ou seja, geraria o melhor desempenho. A prescrição de treinamento com base nesse princípio também já é presente para alguns dos grandes atletas mundiais e foi inspirada, em parte, nas drogas inteligentes, tratamento farmacológico consideravelmente mais eficiente do que o convencional, no qual o medicamento é escolhido também com base em certas seqüências do DNA genômico de cada atleta (Bueno Jr e Pereira, 2010).

2.2 GENÉTICAS, FENÓTIPOS MUSCULARES E ATIVIDADE FÍSICA

Segundo Dias et al (2007) o fenômeno do desempenho físico humano em modalidades esportivas específicas sempre foi alvo de interesse de médicos especialistas em medicina desportiva e fisiologistas do exercício. Esses profissionais confirmavam os níveis *outline* de desempenho de seus atletas a partir de análises morfológicas e funcionais, utilizando-se para isso técnicas histoquímicas, dosagens bioquímicas e análise de parâmetros cardiopulmonares. Acreditava-se que os altos níveis de desempenho dos atletas eram decorrentes de treinamento e acompanhamento nutricional específico, fatores estes essenciais para o desenvolvimento das características dos atletas de elite. No entanto, tais fatores ambientais, por si só, se mostraram, ao longo do tempo, insuficientes para caracterizar um fenótipo de status em desempenho físico humano. A partir dessa constatação surgiu o interesse por um terceiro fator determinante desse complexo fenótipo para a aptidão física, isto é, a predisposição genética que, se não o mais importante, tem grandes implicações na caracterização do indivíduo como atleta de destaque.

As diferenças genéticas baseadas em polimorfismos, com potencial em afetar a aptidão e o desempenho físico humano, começaram a ser investigadas nos anos de 1990 (Rankinen *et al.*, 2001). Atualmente existem cerca de 200 genes que estão associados com os fenótipos de boa forma física relacionada à saúde e os fenótipos de desempenho físico humano (Bray *et al.*, 2009). A identificação de talentos parece estar sendo revolucionada por essas descobertas, com a caracterização gênica do indivíduo pesando como parte significativa na decisão da seleção de jovens talentos. Entretanto, é importante ressaltar que múltiplos fatores biológicos e ambientais são determinantes da desempenho e que a análise de um único gene, isoladamente, não necessariamente determina o fenótipo de um atleta. (DIAS *et al.*, 2007)

Deste modo o exercício pode ser uma variável a ser controlada nas pesquisas sobre os efeitos genéticos em determinados fenótipos. Outra forma de se analisar a interação entre fatores genéticos e ambientais é comparar a diferença de resposta entre determinados fenótipos, pois a resposta ao exercício é altamente variável entre os indivíduos, o que também pode ser mediado por variações genéticas (Bray, 2000). Portanto, além de influenciar diretamente nos fenótipos musculares, se reconhece que os fatores genéticos podem interferir na resposta ao treinamento (Thomis *et al.*, 1998; Beunen & Thomis, 2004; Thomis *et al.*, 2004; Brutsaert & Parra, 2006).

As pesquisas relativas à associação entre genética e exercício normalmente envolvem investigações de genes que afetam medidas reconhecidamente influenciadas pelo exercício, como massa muscular, densidade mineral óssea, força muscular, entre outras (Dias *et al.*, 2007). E para que os resultados das pesquisas sejam mais precisos, as buscas são baseadas nos efeitos biológicos dos genes, de modo a selecionar fatores associados diretamente aos fenótipos estudados. Nesse sentido, um dos fatores genéticos que tem recebido destaque por sua suposta influência nos níveis de força e massa muscular é o gene da α – Actinina – 3 (ACTN3) e ECA I/D, objetos desse estudo e de outros (Yang *et al.*, 2003; Clarkson *et al.*, 2005; Niemi & Majamaa, 2005; Rankinen *et al.*, 2010). É importante ressaltar que múltiplos fatores biológicos e ambientais influenciam também o rendimento esportivo e que a análise de um único gene de forma isolada, não necessariamente determina o fenótipo de um atleta (Macarthur; North, 2005; 2007). Ainda assim, considerando todos os fatores ambientais na formação do atleta, entre os esportistas de mais alto

nível competitivo, pode ser que a expressão genética seja o fator de diferenciação entre eles.

Para Dias (2011) há quem ousou dizer que atletas são pessoas comuns que nascem e são preparadas para serem atletas, levantando a possibilidade de que o desempenho físico e a destreza esportiva são exclusivamente o resultado de horas despendidas em concentração e treinamento físico. Ericsson et al (1993) admitem que a estatura e outras características estruturais corporais favorecem o sucesso em determinadas modalidades esportivas, mas reforçam o fato de que a assiduidade ao treinamento físico é fator importante e que pode sobrepor-se a qualquer contribuição proveniente dos genes. No entanto, é pouco provável que esta teoria corresponda a realidade a partir do momento em que o desempenho físico humano é reconhecido como fenótipo multifatorial, ou seja, controlado pela interação entre diversos fatores ambientais e determinado por fatores genéticos. Em termos práticos, o treinamento físico (fator ambiental) comprovadamente induz adaptações morfofuncionais nos diversos sistemas fisiológicos, mas o grau da adaptação depende das interações entre múltiplos genes, que por sua vez são modulados por múltiplas variantes genéticas. A identificação dos genes e variantes genéticas com potencial em influenciar variáveis fisiológicas em resposta ao treinamento físico é a base para a compreensão do que vem a ser o potencial genético de um atleta.

Nesta nova era, a da medicina genômica, o mapeamento e sequenciamento do DNA tornou possível rastrear o genoma humano com a intenção de identificar estes genes e as variantes genéticas que o afetam e, conseqüentemente, caracterizar geneticamente os “fenômenos” do esporte de alto rendimento.

Pessoas “comuns” e atletas de elite têm absolutamente os mesmos genes. O que o genoma de atletas pode apresentar de diferente, em comparação ao genoma das pessoas “comuns”, são variantes no código dos genes específicos envolvidos na modulação dos fenótipos de desempenho física (Dias, 2011).

Seguindo o raciocínio de Dias (2011) os fenótipos de capacidade cardiorrespiratória, “endurance”, força e potência muscular e intolerância ao exercício físico são multigênicos, ou seja, controlados por vários genes. As adaptações fisiológicas em resposta ao treinamento físico acontecem como consequência das alterações de expressão gênica. Cada gene com expressão alterada contribui com uma parcela da modulação total que ocorre em um fenótipo.

A grande maioria das 200 variantes identificadas e proveniente de estudos de associação em genética que testaram o potencial de uma variante genética em um gene isolado tem de afetar um fenótipo multigênico, como resultados, foram identificados genes que conferem desde pequena a moderada participação na regulação daqueles fenótipos. Vale ressaltar que, eventualmente, uma única variante genética em um gene específico pode apresentar grande participação na regulação de um fenótipo multigênico. Um atleta olímpico e recordista em determinada modalidade pode apresentar variantes genéticas que amplificam ou inibem determinadas funções fisiológicas. Esta bagagem genética só pode ser conhecida mediante a genotipagem do atleta (Dias, 2011).

Para Gonzalez-Freire et al (2009) estudos caso-controle, que demonstram maior frequência de variantes em genes associados ao desempenho físico em atletas, quando comparados a indivíduos da população geral, somado aos achados sobre a rara combinação genotípica em atletas, sustentam a afirmação de que a genética é o determinante indispensável para a excelência no esporte de alto rendimento. Interessantemente, um indivíduo portador do maior número de genótipos associados ao desempenho físico não necessariamente estaria representando sua nação no esporte de alto rendimento. A bagagem genética somada às oportunidades e ao contexto social e econômico são quem evidenciam um atleta. Para Dias (2011) talvez o maior talento esportivo existente no mundo nunca tenha sido estimulado a explorar o seu potencial atlético.

Em sua revisão, Dias (2011) conclui que os avanços da genômica funcional vêm comprovar o que há tempos eram apenas suspeitas. A excelência no esporte de alto rendimento, dependente em parte do máximo desempenho físico, esta sob o controle de genes. Embora o rastreamento dos genes moduladores dos complexos fenótipos de desempenho físico esteja em andamento, já é possível compreender como variantes em genes específicos modulam as adaptações ao treinamento físico, sustentando as hipóteses do porque aqueles indivíduos mais responsivos se tornam os “fenômenos” do esporte.

2.3 ESTRUTURA E FUNCIONAMENTO DA α – ACTININA 3

Fenótipo bem caracterizado em atletas de diferentes modalidades é o tipo de fibra da musculatura esquelética. Em adultos, esse fenótipo é determinado pela

expressão de três genes distintos que, quando transcritos e traduzidos, sintetizam isoformas de cadeia pesada da miosina (MHC), determinando, em parte, a distribuição percentual dos diferentes tipos de fibra no músculo. Aproximadamente 45% das variações do tipo de fibra no músculo são explicadas por fatores genéticos (Simoneau & Bouchard, 1995). Essa distribuição constitui-se num dos fatores determinantes do desempenho em modalidades esportivas.

Independente da heterogeneidade e da distribuição dos diferentes tipos de fibra na musculatura esquelética, a contração muscular é dependente da interação das proteínas miofibrilares miosina e actina (Scott et al 2001). A organização estrutural e a manutenção do aparato muscular contrátil são dependentes ainda de complexos protéicos que ligam os sarcômeros entre si e os sustentam na membrana da fibra muscular. Nesse contexto, a α -actinina constitui a proteína predominante. As alfa-actininas (figura 1), são uma família de proteínas relacionadas à distrofina que se ligam à actina, e são importantes para a ligação e fixação dos miofilamentos (North & Beggs, 1996; Mills *et al.*, 2001). Quatro genes para alfa-actinina foram encontrados em humanos: ACTN1, ACTN2, ACTN3 e ACTN4. As ACTN1 e ACTN4 são proteínas não-musculares presentes nos rins e tecidos cancerígenos (Honda et al, 1998), enquanto as ACTN2 e ACTN3 são proteínas miofibrilares localizadas no disco Z.

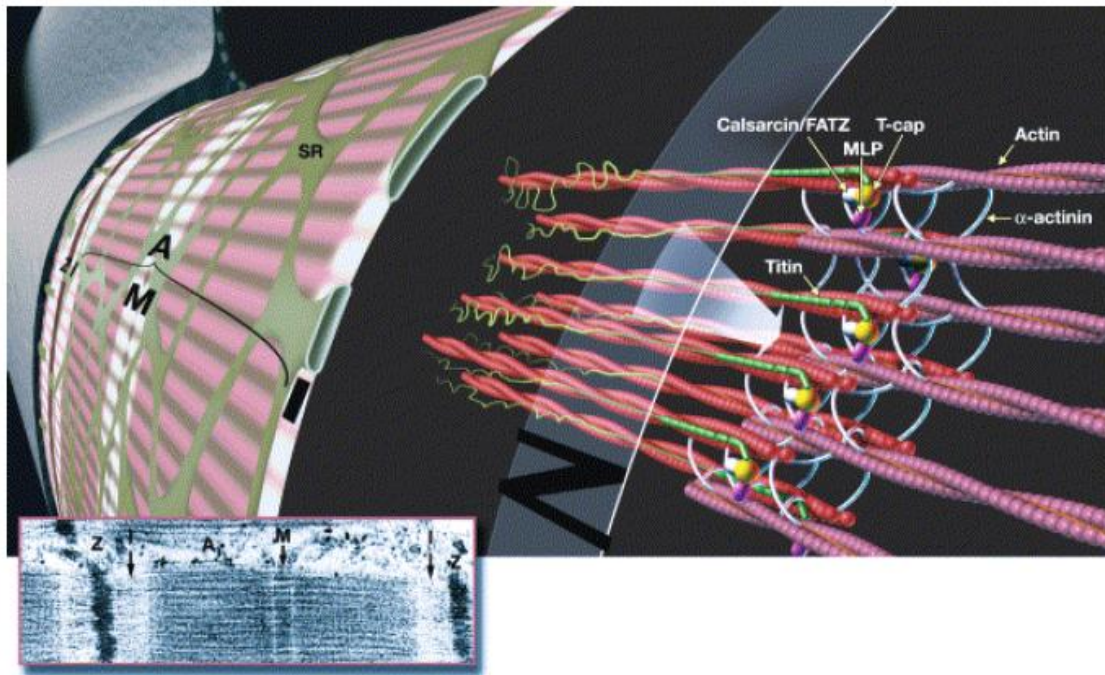


Figura 1. Arquitetura do disco Z. (Z), o disco Z; (M), a linha M; (A), banda A, (I), banda I; (SR), retículo sarcoplasmático. Figura de (Epstein e Davis, 2003). Observe a localização específica de alfa-actinina no disco Z (retirado de Pimenta, 2012).

A ACTN3 é uma componente da linha Z sarcomérica, pertencente à família das proteínas ligantes da actina, importante no ancoramento dos miofilamentos de actina e manutenção do arranjo miofibrilar. A ACTN3 é uma isoforma característica das fibras rápidas, expressa apenas nas fibras tipo II (Beggs *et al.*, 1992; North *et al.*, 1999; Mills *et al.*, 2001), as quais são responsáveis pela geração de contrações rápidas e intensas, como em atividades de sprint e levantamento de peso. As funções exatas da ACTN3 ainda não são conhecidas, mas sugere-se que ela tenha função estrutural na manutenção da integridade mecânica e na contração muscular (Mills *et al.*, 2001; MacArthur & North, 2007) e pode influenciar na tipologia das fibras (Vincent *et al.*, 2007). Esta proteína é parte do mecanismo contrátil das fibras rápidas e duas de suas principais funções são unir os filamentos contidos na actina e estabilizar o aparato contrátil do músculo (Beggs *et al.*, 1992; MacArthur & North, 2004). Além do papel mecânico, as alfa-actinas também interagem com proteínas envolvidas na sinalização e metabolismo muscular (Mills *et al.*, 2001; MacArthur & North, 2004). O gene ACTN3 localiza-se no cromossomo 11q13-q14 e foi clonado por Beggs *et al.* (1992). Posteriormente, um polimorfismo funcional no gene ACTN3

foi identificado em humanos por North et al. (1999). O polimorfismo, definido pela troca entre Citosina e Timina na posição do 1747 do exon 16, resulta na troca de Arginina (alelo R) por um códon de terminação (alelo X) no aminoácido 577, sendo identificado como R577X. A mutação leva à ausência de detecção da proteína em indivíduos homozigotos para o alelo X (North *et al.*, 1999), provavelmente porque a proteína trocada é rapidamente degradada pelo organismo (MacArthur & North, 2004). Apesar da frequência dos alelos diferir entre populações, estima-se que aproximadamente 16% a 21% da população seja homozigotos para o polimorfismo não-funcional, XX (North *et al.*, 1999; Mills *et al.*, 2001; MacArthur & North, 2007; Moran *et al.*, 2007; Paparini *et al.*, 2007).

Dias et al (2007) em sua revisão escreve que indivíduos homozigotos para o alelo 577X não expressam a α -actinina 3. Curiosamente, a deficiência da α -actinina 3 não resulta em fenótipo patológico como distrofia muscular ou miopatias, sugerindo que a isoforma ACTN2 (81% de homologia na sequência de aminoácidos) poderia compensar a ausência da α -actinina 3 (Mills, 2001).

Em adição à sua função estrutural na maquinaria contrátil muscular, as α – actininas sarcoméricas estão envolvidas como proteínas reguladoras do metabolismo e de vias de sinalização, como a frutose 1,6 bifosfato e o glicogênio fosforilase (MacArthur et al, 2004).

No entanto, o papel das α – actininas no músculo esquelético parece ser mais complexo, uma vez que elas também interagem com uma vasta gama de sinalização e proteínas metabólicas associadas com a linha Z. Assim, a expressão diferencial das α – actininas sarcoméricas, e particularmente a expressão especializada da α – actinina 3 nas fibras de contração rápida, também pode influenciar o metabolismo músculo esquelético e/ou tipo de fibras específicas (MacArthur & North, 2011).

2.4 FENÓTIPOS ESPORTIVOS E ALFA-ACTININA 3.

Além de influenciar diretamente nos fenótipos musculares, os fatores genéticos também podem interferir na resposta ao treinamento (Thomis *et al.*, 1998; Beunen & Thomis, 2004; Thomis *et al.*, 2004; Brutsaert & Parra, 2006; Clarkson et al., 2005; Delmonico et al., 2007; Norman et al., 2009; Ogura et al., 2009). O rendimento esportivo em atividades de predominância de força e velocidade tem sido associado ao gene ACTN3 que é responsável pela expressão da alfa-actinina-3

(ACTN3). Os genótipos que expressam a alfa-actinina-3 (ACTN3-RR e RX) têm sido relacionados a atividades com predominância de força e velocidade (Macarthur *et al.*, 2008; Macarthur; North, 2004, 2007; Moran *et al.*, 2007; Vincent *et al.*, 2007; Walsh *et al.*, 2008; Ruiz *et al.*, 2010; Santiago *et al.*, 2008; Mccauley *et al.*, 2009), e o genótipo que não expressa a alfa-actinina-3 (ACTN3-XX) tem sido associado a atividades de predominância de “endurance” aeróbia (Gómez-Gallego *et al.*, 2009, Ahmetov *et al.*, 2008; Saunders *et al.*, 2007; Chan *et al.*, 2008; Lucia *et al.*, 2006).

Polimorfismo comum da ACTN3 foi identificado em humanos e resulta em um “stop códon” e na falta da proteína detectável em indivíduos homozigóticos (R577X). Homozigóticos para o alelo 577X não são capazes de produzir qualquer proteína ACTN3 em seus músculos, e estima-se que aproximadamente 18% da população são homozigóticos para esta perda de função do polimorfismo (Mills *et al.*, 2001).

Os homozigóticos da ACTN3 de genótipo nulo (XX) não causam nenhuma mudança fenotípica ou histológica muscular, sugerindo que a presença desta proteína não é uma função crítica das miofibras. Consistente com esta afirmação, o gene ACTN2 é expresso nas fibras tipo I e II, e pensa-se que as ACTN2 e ACTN3 são proteínas funcionalmente redundantes, onde ACTN2 compensa a falta da ACTN3 nas fibras tipo II em homozigóticos. Pelo contrário, o gene ACTN3 é altamente conservada através da evolução, sugerindo que ACTN3 é de fato funcionalmente importante para a função e estrutura muscular (Mills *et al.*, 2001). Estas observações levaram à hipótese de que o genótipo ACTN3 pode influenciar a variação em função do músculo em seres humanos.

Apesar de existir pelo menos 73 “loci” genético associados com fenótipos de aptidão e desempenho (Rankinen *et al.*, 2002), a ACTN3 é o primeiro gene estrutural músculo esquelético para os quais uma associação tem sido demonstrada. A função básica para essa vantagem está provavelmente relacionada com o fato de que ACTN3 é a fibra rápida predominante tanto em ratos como em humanos (Mills *et al.*, 2001) e pode conferir uma maior capacidade para absorção ou transmissão de força na linha Z durante a contração rápida. Assim a ACTN3 pode promover a formação de fibras de contração rápida ou alterar o metabolismo da glicose em resposta ao treinamento.

Yang *et al.* (2003) sugerem que um individuo é inerentemente predisposto para o desempenho em uma área (sprint/potência versus endurance). Nos seres

humanos, isto parece ter sido alcançado, em parte por meio da manutenção da variação genética, equilibrando a seleção natural. O resultado é que existem diferenças genéticas entre os indivíduos, tais como demonstrado pela ACTN3, que podem ser úteis preditores de desempenho atlético em nível de elite.

Os mesmos autores demonstraram haver associação entre os diferentes genótipos da ACTN3 e o desempenho em atletas de elite. Se a α -actinina 3 desempenha importante função em fibras musculares do tipo II, seria razoável prever diferenças na função muscular esquelética entre indivíduos com diferentes genótipos (R577X) para ACTN3. Para MacArthur et al (2004) indivíduos que expressam o gene ACTN3 (genótipos RR ou RX) podem apresentar vantagem em modalidades que exigem explosão e força muscular quando comparados com indivíduos com genótipo XX.

Para testar tal hipótese, Yang et al.(2003) compararam os genótipos e a frequência dos alelos de 107 atletas de elite velocistas/ força (72 masculinos e 35 femininos), 194 atletas de elite de provas de “endurance” (122 masculinos e 72 femininos) e 436 indivíduos saudáveis não atletas, todos genotipados para o gene ACTN3. Esses autores verificaram uma diferença significativa na frequência dos alelos entre os atletas velocistas/ força e os indivíduos controles, tanto para o sexo masculino ($p < 0,001$) quanto para o feminino ($p < 0,01$). Esses atletas, quando analisados no total (72 masculinos + 35 femininos = 107) apresentaram menor frequência do genótipo XX quando comparados com os indivíduos controles (6% vs. 18%, respectivamente). Das 35 atletas velocistas/força (sexo feminino), nenhuma apresentou genótipo XX. Quando analisados no total, atletas velocistas/força (107 indivíduos) apresentaram maior frequência do genótipo RR e menor frequência do genótipo RX (50% e 45%, respectivamente), comparados com grupo controle (39% e 52%, respectivamente). O ponto interessante do estudo foi a comparação entre atletas velocistas/ força e atletas de “endurance” que mostraram frequência dos alelos em direções opostas, sendo os valores significativamente diferentes para ambos os sexos. A frequência do genótipo XX no sexo masculino foi de 20% para atletas de “endurance” e 8% para atletas de velocistas/força; no sexo feminino 29% para atletas de “endurance” e 0% para atletas velocistas/força. A frequência do genótipo RR no sexo masculino foi de 28% para atletas de “endurance” e 53% para

atletas velocistas/ força; no sexo feminino 36% para atletas de “endurance” e 43% para atletas de velocistas/força.

MacArthur e North (2011) determinaram o genótipo R577X para cada amostra de DNA em 107 atletas que competiam eventos de velocidade e potência (corridas de curta distancia, natação e ciclismo) e 194 atletas de endurance (corridas de longa distancia, ciclismo e ski cross-country), permitindo assim a comparação da freqüência da deficiência entre grupo de atletas e grupo controle. Os resultados dessa análise são apresentados na figura 2. Esses dados sugerem que a presença da ACTN3 é necessária para um ótimo desempenho de fibras de contração rápida em atletas de eventos de potência e velocidade, enquanto que a ausência da ACTN3 pode fornecer algum tipo de vantagem para atletas de “endurance”. Assim, o polimorfismo R577X juntou-se a lista crescente da genética de fatores que podem influenciar o desempenho atlético (Wolfarth et al, 2005).

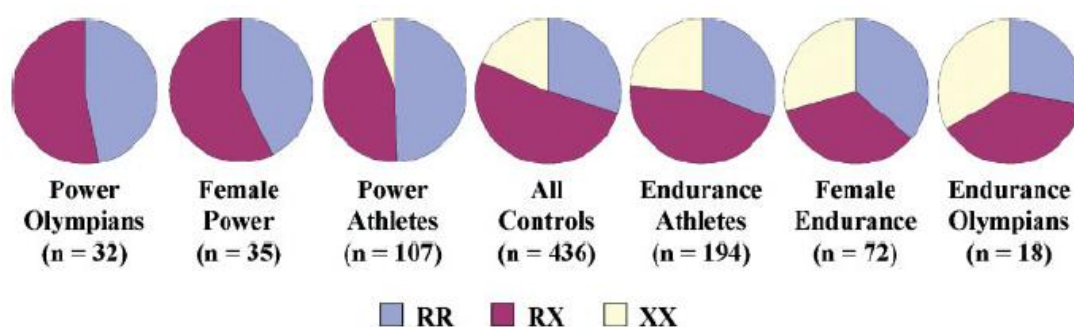


Figura 2. Freqüências dos três genótipos

ACTN3 R577X nos controles e atletas de elite. Atletas do sexo feminino e atletas que competiram em um nível olímpico são mostrados como grupos separados para potência e resistencia. Diferenças significativas de freqüências genotípicas nos controles foram observadas para os atletas de potência total ($P < 0,0001$), atletas de força do sexo feminino ($P < 0,05$), atletas olímpicos de potência ($P < 0,01$) e atletas femininas de resistência ($P < 0,05$). (MacArthur e North, 2011)

A associação entre R577X e o desempenho de atletas certamente tem respaldo biológico: o polimorfismo R577X tem um claro efeito bioquímico, eliminando completamente a produção da função da proteína ACTN3, além disso a localização da ACTN3 na fibra muscular de contração rápida é consistente com um efeito negativo da deficiência da ACTN3 no desempenho de velocidade e potência (MacArthur e North, 2011).

Estudo com atletas Finlandeses (Niemi & Majamaa, 2005) comparou a freqüência da deficiência da ACTN3 em um grupo de 68 atletas velocistas, 40 atletas

de endurance e 120 controles etnicamente pareados, e encontraram padrão muito similar ao estudo com atletas australianos: diminuição acentuada na frequência da deficiência de ACTN3 em atletas velocistas, e um ligeiro (mas não significativa) da frequência do genótipo XX em atletas de endurance. Em ambos os casos, estas tendências foram mais evidentes em atletas que competiam internacionalmente.

Desde então, a frequência do genótipo XX diminuiu significativamente nos controles, o que foi observado por Papadimitriu et al (2008) em 34 velocistas e 73 atletas de potência, 486 atletas russos de força (Druzhevskaya et al., 2008), 52 fisiculturistas e levantadores de peso brancos (Roth et al, 2008), e 81 israelenses velocistas (Eynon et al, 2009). Em conjunto, esses estudos fornecem suporte de que a presença de ACTN3 é importante para o ótimo desempenho de fibras rápidas em atividades de velocidade e potência.

O aparente benefício da presença do alelo 577R em atletas velocistas/força é consistente com a localização da α -actinina 3 em fibras da musculatura esquelética de rápida contração. Por outro lado, MacArthur e North (2004) sugerem que a ausência da expressão do gene ACTN3 (genótipo XX) estaria relacionada à melhor desempenho em provas de “endurance”. No entanto, os mesmos autores alertam para o fato de que estudos de associação em genética apresentam limitações e que a interpretação da associação de um único gene com um determinado fenótipo deve ser cautelosa.

2.5 ESTRUTURA E FUNCIONAMENTO DA ENZIMA CONVERSORA DA ANGIOTENSINA (ECA I/D)

O polimorfismo I/D da ECA foi a primeira variante genética a ser associada com o desempenho físico humano por Montgomery *et al.* (1998) que demonstraram maior e menor frequência dos alelos I e D, respectivamente, em montanhistas, quando comparados ao controle e ainda uma maior resposta a um teste de “endurance” muscular localizada pós-treinamento no genótipo II quando comparados aos outros genótipos (ID e DD). Desde então o polimorfismo da ECA ganhou atenção dos pesquisadores da área da atividade física e do esporte.

O gene humano que codifica a ECA está localizado no cromossomo 17 (q22-24) e apresenta polimorfismo que consiste na ausência (deleção, D) ou presença (inserção I) de 287 pares de base no íntron 16 (RIGAT *et al.*, 1990). O alelo D está associado à maior atividade da ECA tanto no plasma, quanto nos tecidos

(PUTHUCHEARY *et al.*, 2011), assim, homozigotos para o alelo D (genótipo DD) apresentam maior atividade da ECA quando comparados com os genótipos ID e II. Essa maior atividade da ECA para o alelo D, aumenta a síntese de angiotensina II e a degradação da bradicinina (JONES *et al.*, 2002).

Aumento da atividade da ECA exerce influência na hipertrofia do músculo cardíaco, uma vez que a angiotensina II age como agente de crescimento muscular, provavelmente mediado pela atividade de receptores AT₁R (Angiotensina Tipo I Receptor) (PUTHUCHEARY *et al.*, 2011). Além disso, a bradicinina age como inibidor do crescimento muscular cardíaco via receptores BK₂R (BRULL *et al.*, 2001). Portanto, é de se esperar que o alelo D esteja associado com maior hipertrofia cardíaca em resposta ao treinamento. De fato, foi observada associação entre a magnitude da resposta da hipertrofia cardíaca a 10 semanas de treinamento militar e os genótipos *ACE I/D*. O aumento da massa do ventrículo esquerdo foi de 2.0, 38.5 e 42.3g, nos grupos II, ID e DD, respectivamente (MONTGOMERY *et al.*, 1997).

Contudo, como visto, a maioria dos estudos demonstraram a associação do alelo I, ao invés do D, com o desempenho de “*endurance*”, apesar da menor resposta de crescimento cardíaco, sugerindo haver outro mecanismo envolvido (PUTHUCHEARY *et al.*, 2011).

O músculo esquelético humano apresenta um sistema renina-angiotensina independente, o qual parece influenciar em determinadas propriedades. Por exemplo, Williams *et al.* (2000) examinaram as alterações da eficiência mecânica (energia utilizada por unidade de potência) e observaram aumento de 8,62% nos indivíduos II e redução de 0,39% para os DD após 11 semanas de treinamento aeróbio. Os autores citam que possivelmente as diferenças podem ser atribuídas a maiores concentrações de óxido nítrico em indivíduos II, melhorando a respiração mitocondrial (a ECA é inibidora da produção de óxido nítrico) e/ou diferenças nas proporções das fibras musculares.

De fato, é possível que o polimorfismo *ACE I/D* influencie de alguma forma na distribuição de fibras musculares. Zhang *et al.* (2003) demonstraram que indivíduos do genótipo II apresentaram porcentagem significativamente maior de fibras do tipo I (50,1±13,9% vs 30,5±13,3%) e menor de fibras do tipo IIb (16,2±6,6% vs 32,7,4%) quando comparados aos do genótipo DD (Figura 3), o que pode explicar, pelo

menos em parte, a associação da *ACE I/D* com a *desempenho de endurance* e *força/potência*.

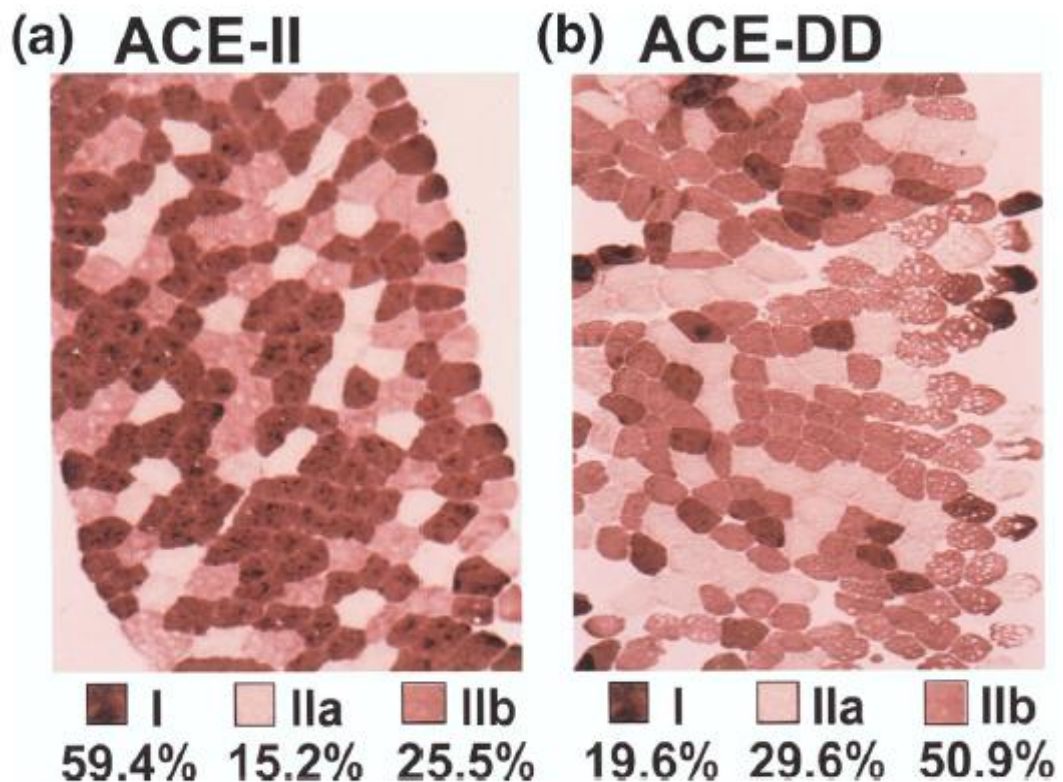


Figura 3 - Distribuição de fibras (vasto lateral) de um indivíduo II e um DD (ZHANG *et al.*, 2003)

Além disso, parece que a angiotensina II esteja envolvida diretamente na hipertrofia muscular esquelética. Gordon *et al.* (2001) demonstraram em ratos submetidos a sobrecarga induzida cirurgicamente que a inibição da produção endógena de angiotensina II via antagonista oral atenuou a hipertrofia dos músculos plantar e sóleo em 57% e 96%, respectivamente. Ainda, a administração de antagonista do receptor AT_1 resultou em 48% de atenuação da hipertrofia. Os autores concluíram que a angiotensina II parece ser necessária para resposta ótima da hipertrofia muscular, agindo via receptores AT_1 .

Além do efeito hipertrófico direto, a angiotensina II pode influenciar outras propriedades musculares como: direcionamento do fluxo sanguíneo para as fibras do tipo II, aumento do consumo de O_2 pelo músculo e aumento da tensão de contração (JONES e WOODS, 2003).

2.6 POLIMORFISMO ACE I/D E DESEMPENHO FÍSICA

Os polimorfismos de genes candidatos a explicar as variações de aptidão humana com respeito aos fenótipos de *desempenho*, estão sendo direcionados para características voltadas à força/potência (Santiago, C., et al 2010; Scott, R.A., et al 2010) *endurance* (Ruiz, J.R., et al 2009; Collins, M., et al 2004) e perfil poligênico ótimo para característica fenotípica (Ahmetov, I.I., et al 2008; Ruiz, J.R., et al 2010; Santiago, C., et al 2010; Williams, A.G., et al 2008).

Dentre as diferentes variantes genéticas candidatas mais investigadas nos estudos envolvendo atletas está o polimorfismo de inserção (alelo I) ou deleção (alelo D) de 287 pares de base *alu* repetidos do gene *ACE* que codifica a atividade da enzima conversora da angiotensina (ECA), com fragmentos de 190 para o alelo D e de 490 pares de bases para o alelo I (Juffer, P., et al 2009; Lucía, A., et al 2004) localizadas no cromossomo 17 posição q232, descrito como relacionado ao desempenho físico (Gayagay, G., et al 1998; Montgomery, H.E., et al 1998) apresenta-se como o polimorfismo genético mais investigado na literatura ao longo dos últimos anos (Calò, C.M., et al 2008; Macarthur, D.G., et al 2005).

O enfoque de grande parcela das pesquisas atualmente encontra-se direcionado para a caracterização de vários polimorfismos na população geral (controles) e seus respectivos grupos de atletas com diferentes níveis competitivos (elite e não elite) (Scott, R.A., et al 2010; Ruiz, J.R., et al 2009; Ahmetov, I.I., et al 2008; Montgomery, H.E., et al 1998; Cieszczyk, P., et al 2009; Kim, C.H., et al 2010; Myerson, S., et al 1999; Nazarov, I.B., et al 2001; Yang, N., et al 2003) da mesma forma para o grau de responsividade ao treinamento físico em amostra de homens e mulheres (Clarkson, P.M., et al 2005; Delmonico, M.J., et al 2007; Folland, J., et al 2000) área de secção transversal da coxa (Zempo, H., et al 2010), proporção de diferentes tipos de fibras musculares (Ahmetov, I.I., et al 2006; Vincent, B., et al 2007; Zhang, B., et al 2003) ou até mesmo a frequência entre alelos de atletas de diferentes categorias e níveis competitivos (Scott, R.A., et al 2010; Montgomery, H.E., et al 1998; Woods, D., et al 2001).

Contudo, algumas lacunas ainda estão carentes de serem melhores esclarecidas na literatura relacionadas aos polimorfismos genéticos, tendo em vista que o desempenho dos atletas parece estar associada a um “perfil genotípico favorável” para uma determinada característica (Lucía, A., et al 2010), predispondo os atletas com este perfil uma condição direcionada para seleção natural perante as modalidades esportivas (Ahmetov, I.I., et al 2008).

Diante da observação que atletas de diferentes características podem exibir diferenças em relação às frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo *ACE I/D* alguns autores testaram a hipótese da sua influência em fenótipos de *desempenho*. Contudo, tal associação ainda não é clara.

Uma possível relação do polimorfismo do *ACE* com o desempenho físico avaliada por diversos autores compara a distribuição dos diferentes genótipo em atletas e a população geral (controle). Como já citado, o primeiro estudo a comparar a frequência genotípica com a população controle foi o de Montgomery *et al.* (1998), demonstrando maior frequência do genótipo II em atletas de *endurance* (montanhistas). Os autores ainda citam que, nenhum dos montanhistas que já realizaram escaladas acima de 8000m sem o uso de oxigênio apresentou o genótipo DD.

Ainda em 1998 um estudo de Gayagay *et al.*, demonstraram que atletas de *endurance* (remadores) australianos possuíam excesso do alelo I ($p < 0,02$) e do genótipo II ($p = 0,03$) quando comparados ao grupo controle.

Como visto o alelo I vem sendo associado à maior *desempenho* de *endurance*. Estudo de Thompson et al (2007) mostrou, em escaladores (claramente dependentes da capacidade de *endurance*), que a altitude máxima alcançada foi influenciada pelo alelo I, sendo $8079 \pm 947\text{m}$ para o genótipo DD, $8107 \pm 653\text{m}$ para o ID e $8559 \pm 565\text{m}$ para o II ($p = 0,007$). Ainda, em outro estudo do mesmo autor Thompson et al (2007) demonstraram que em um grupo de 284 escaladores, o sucesso em alcançar o cume do Mont Blanc foi influenciado pelo genótipo *ACE I/D* (87,7% para DD; 94,9% para ID e 100% para II; $p = 0,048$).

Em investigação conduzida por Collins *et al.* (2004) envolvendo triatletas de várias nacionalidades e sul-africanos que completaram a competição do Ironman entre 2000 e 2001, os autores não conseguiram evidenciar diferenças nas frequências genotípicas ou nas frequências alélicas dos triatletas sul-africanos comparadas ao grupo controle de sul-africanos. No entanto, quando os autores dividiram os atletas em subgrupos, os mais rápidos a completarem a competição apresentaram significativamente maior frequência do alelo I (51,5%) em relação ao grupo controle de sul-africanos (42,2%).

Em outro estudo foram analisados atletas remadores de ambos os sexos subdividindo por qualificação no ranking e por gênero, encontraram nas mulheres atletas com qualificação de candidatas a alto nível que possuíam o genótipo II maior potência máxima no teste incremental em ergômetro de remo comparativamente as atletas carreadoras do alelo D (ID ou DD). Além disso, nas atletas de alto nível carreadoras do alelo I, foi observada maior contribuição do metabolismo aeróbio no fornecimento de energia durante teste incremental em virtude da menor concentração de lactato imediatamente após a exaustão voluntária no teste, sendo, $7,7 \pm 2$ mM, $8,1 \pm 1,1$ mM e $9,7 \pm 1,3$ mM, para os genótipos II, ID e DD ($r=0,47$; $p=0,03$) (AHMETOV *et al.*, 2008).

Outro estudo, onde os atletas foram agrupados por predominância metabólica das distâncias de corrida foi publicado por Myerson *et al.* (1999). Subdividindo os atletas em grupos de ≤ 200 m, 400–3,000m e $\geq 5,000$ m, encontraram tendência significativa ($p=0,009$) de aumento na frequência do alelo I com aumento da distância de corrida, sendo 35%, 53% e 62% para ≤ 200 m, de 400–3,000m e $\geq 5,000$ m, respectivamente, encontrando também diferenças significativas nas distribuições alélicas ($p=0,012$) e genotípicas ($p=0,020$).

Em jovens do gênero masculino moderadamente ativos, Almeida *et al.* (2012) encontraram valores significativamente maiores de VO_2 máx no grupo II (54,4 ml/kg/min) quando comparados aos grupos ID (51,9 ml/kg/min) e DD (45,6 ml/kg/min).

Já a relação do alelo D com indicadores de *desempenho* de força/potência parece ter menos dados na literatura.

Woods *et al.* (2001) demonstraram que amostra composta por nadadores de elite de europeus de várias distâncias apresentaram excesso do alelo D quando

comparados a grupos controle. A maior frequência do alelo D se manteve quando foram analisados apenas os nadadores de menores distâncias (400 m ou menos), porém o mesmo não ocorreu com as distâncias maiores. Ainda, os autores não encontraram diferença na frequência do alelo D em nadadores americanos que não eram considerados de elite.

Outro estudo interessante foi publicado por Nazarov *et al.* (2001) que dividiram atletas russos das modalidades de Natação, Atletismo, Esqui Cross-Country e Triathlon em grupos de acordo com a duração dos eventos (curta, média e longa) e nível de *desempenho* (excelentes e médios). Os autores não encontraram diferenças significantes nas frequências genotípicas e alélicas quando todos os atletas foram agrupados, assim como, para o grupo de atletas excelentes nas frequências genotípicas e alélicas comparadas ao grupo controle. Porém, com a distribuição dos atletas por distância dos eventos, encontraram significativamente ($p=0,001$) maior frequência do alelo D nos atletas excelentes do grupo de curta duração e excesso do alelo I nos atletas de nível excelente do grupo de média duração ($p=0,032$), não sendo diferentes as frequências genotípicas dos atletas de nível excelente de longa duração comparada ao grupo controle.

Com atletas de futebol, Micheli *et al.* (2011) observaram diferenças significativas ($p=0,02$) para o salto vertical no teste de *squat jump* (SJ) nos atletas portadores do genótipo ID ($37,4 \pm 4,0$ cm) do que nos genótipos DD ($33,1 \pm 3,9$ cm) e II ($30,4 \pm 4,6$ cm), resultados similares foram observados no teste *counter movement jump* (CMJ) ($p=0,04$), com maiores índices de salto vertical nos atletas com genótipo ID ($38,8 \pm 3,6$ cm), do que nos demais genótipos DD ($35,9 \pm 4,1$ cm) e II ($34,7 \pm 1,9$ cm). Não foram evidenciadas diferenças significativas entre os genótipos para os tempos de 20 e 30 metros de corrida e arremesso de *medicine ball* de 2kg.

Gomez-Gallego *et al.* (2009) compararam o polimorfismo do gene *ECA* I/D em ciclistas capazes de finalizar uma edição do *Tour de France* incluindo atletas que venceram algumas etapas ou top três finalistas na classificação final da competição. Os autores não encontraram diferenças estatisticamente significativas no $VO_{2\text{máx}}$ genótipos II e DD. Porém, a potência pico relativa do genótipo II ($7,1 \pm 0,1 \text{ W.kg}^{-1}$) foi significativamente menor que a do genótipo DD ($7,3 \pm 0,1 \text{ W.kg}^{-1}$). De maneira semelhante para a potência relativa no limiar ventilatório (LV_1) no grupo II ($4,3 \pm 0,2 \text{ W.kg}^{-1}$) e DD ($4,5 \pm 0,1 \text{ W.kg}^{-1}$) com diferença significativa e para a potência relativa

ao limiar de compensação respiratória entre os genótipos II ($5,9 \pm 0,1 \text{ W.kg}^{-1}$) vs DD ($6,0 \pm 0,1 \text{ W.kg}^{-1}$). Vale ressaltar que embora seja uma modalidade de longa duração, a força/potência é uma característica marcante em atletas de ciclismo, principalmente nos velocistas.

Já no estudo realizado por Tobina *et al.* (2010) associando os genótipos *ECA* com as melhores *desempenhos* de 37 corredores (>5,000m) japoneses de elite, os autores encontraram que os indivíduos ID e DD obtiveram tendência ($p=0,053$) a maiores velocidades de corrida do que os homozigotos para o alelo I, e quando foram agrupados os atletas pelos genótipos (ID+DD vs II) os atletas com a presença do alelo D possuíam maior velocidade de corrida ($p=0,023$). Neste caso claramente o alelo D foi associado ao desempenho de *endurance*.

Outro exemplo de associação inversa ao que seria esperado é o estudo de Kim *et al.* (2010). Ao analisar um grupo de atletas coreanos de potência de diversas modalidades e dividindo os mesmos pelo nível de *desempenho*, observaram redução gradual da frequência do genótipo DD a medida que aumentava o nível de *desempenho*. Os autores concluíram que os atletas do genótipo DD tinham 3,83 vezes menor probabilidade de sucesso em esportes de potência do que os outros genótipos (II e ID).

Há estudos onde não foram encontradas diferenças em relação ao grupo controle (RANKINEN *et al.*, 2000; SCOTT *et al.*, 2005; SCOTT *et al.*, 2010), estudos onde os resultados são controversos aos apresentados, com o alelo D associado a eventos de *endurance* (AMIR *et al.*, 2007) e ainda, estudos que não encontraram nenhuma relação do polimorfismo *ECA I/D* com indicadores de desempenho (SCOTT *et al.*, 2005; DAY *et al.*, 2007; SHENOY *et al.*, 2010).

Diante dos dados de estudos de associação que encontraram relação do polimorfismo *ECA I/D* com indicadores do desempenho, parece que o alelo D é mais frequente em eventos de força/potência, enquanto o alelo I é mais frequente em eventos de *endurance*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo tem como objetivo analisar a associação dos polimorfismos dos genes da ACTN3 (R577X) e ECA I/D com indicadores do desempenho de atletas de diferentes modalidades. Esses dois genes foram selecionados por estarem associados com o desempenho atlético (WANG, G., MIKAMI, E., CHIU, L. et al, 2013).

Como prevê o Conselho Nacional da Saúde (Res. 466/12) envolvendo pesquisas com seres humanos, todos os voluntários após as explicações sobre procedimentos e possíveis riscos, assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 1). Estas precauções foram adotadas com o intuito de preservar a privacidade, a saúde e o bem-estar dos voluntários. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e aprovado (Registro CONEP 5231) (ANEXO 2).

3.1 POPULAÇÃO E AMOSTRA

Participaram do estudo 176 atletas (Masculino n=100 e Feminino n=76) de 22 modalidades esportivas do Estado do Paraná. Todos os atletas faziam parte do programa do Talento Olímpico do Paraná (TOP 2016). Os atletas foram divididos por categoria de bolsa (Escolar, Nacional e Internacional), determinada pela Secretaria de Estado de Esporte e pelas Federações Específicas de cada modalidade. Todos os atletas foram selecionados como os melhores atletas do Estado do Paraná em suas modalidades específicas de acordo com cada Federação. Para seleção da amostra foi adotado o procedimento de amostragem intencional não probabilística por conveniência.

As modalidades Judô (N=7), Taekwondo (N=14), Luta Greco Romana (N=1), Wrestling (N=1), Boxe (N=3) e Esgrima (N=2) foram agrupados na modalidade LUTAS. As modalidades Tênis de Mesa (N=10), Tênis de Campo (N=8) e Badminton (N=5) foram agrupadas na modalidade de ESPORTES DE RAQUETE. As modalidades de Natação (N=15), Nado Sincronizado (N=1) e Triathlon (N=1) foram agrupados em AQUATICOS. As modalidades de Ginástica Artística (N=3) e

Ginástica Rítmica (N=9) foram agrupadas em GINÁSTICA. As modalidades de Basquete (N=7), Futsal (N=3), Volei (N=6) e Handebol (N=9) foram agrupados em ESPORTES DE QUADRA.

Os atletas que participaram da amostra têm idade entre 11 e 35 anos. Esses atletas mantinham treinamentos regulares e participavam de competições a nível escolar, nacional e Internacional de acordo com suas categorias. As modalidades e o número de atletas para cada modalidade estão descritos na tabela abaixo:

Tabela 1: Modalidades, gênero e categoria de nível de desempenho.

MODALIDADE	nº total	nº fem	nº masc	nº escolar	nº nacional	nº internacional
Atletismo	47	22	25	42	5	0
Esp. de Quadra	25	10	15	20	3	2
Canoagem	5	0	5	2	1	2
Ciclismo	11	7	4	9	2	0
Ginastica	12	9	3	9	2	1
Lutas	28	8	20	17	8	3
Aquáticos	17	8	9	8	7	2
Esp. Raquete	23	7	16	17	3	3
Volei de Praia	8	5	3	7	1	0
Total	176	76	100	131	32	13

De acordo com um dos objetivos específicos desse estudo, os atletas também foram divididos em relação à duração do evento. Essa divisão foi realizada de acordo com o estudo de Gineviciene, Pranculis, Jakaitiene, et al (2011) em três grupos de acordo com a duração e distância do evento. 1- O grupo de “endurance” (n=33; fem=11, masc=22) que inclui longa duração (duração >30 min), média duração (5 – 30min), e curta duração (45seg – 5 min). 2- O grupo de potência (n=62; fem=34, masc=28) que inclui os atletas de potência e velocidade, com predominância na produção de energia anaeróbica. 3- O grupo misto (n=81; fem=26, masc=55) compreende os atletas de esportes que utilizam produção de energia mista tanto anaeróbica quanto aeróbica.

Tabela 2: Duração de evento, gênero e categoria de bolsa

DURAÇÃO EVENTO	nº total	nº fem	nº masc	nº escolar	nº nacional	nº internacional
“Endurance”	33	11	22	25	8	0
Potência	62	34	28	47	10	5
Misto	81	26	55	59	14	8
Total	176	71	105	131	32	13

Todos os atletas tiveram o sangue coletado para a genotipagem do DNA e realizaram avaliações físicas em laboratório. Os procedimentos estão descritos abaixo:

3.2 GENÉTICA

3.2.1.1 Extração e quantificação do DNA do sangue periférico

Para a realização da análise dos polimorfismos genéticos ACTN3 e ECA, um profissional de enfermagem realizou a coleta de amostra sanguínea (4ml) de todos os participantes do estudo por meio da veia antecubital. O material biológico foi colhido em tubos a vácuo estéreis contendo anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). As amostras foram encaminhadas para o laboratório de Genética Toxicológica da Universidade Estadual de Londrina, à temperatura de 4°C e mantidas nesta mesma temperatura por 24 horas, para separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Retira-se visualmente a fração das células brancas (PBMC) e após lava-se e obtém-se “*pellet*” límpido.

Os PBMCs foram retirados com auxílio de micropipeta e transferidos para microtubos de 1,5mL, seguido da adição (1mL) de tampão de lise de hemácias RCLB (Tris-base 6,05g, MgCl₂ 2,39g, NaCl 2,9g, Triton X 20mL, q.s.q 1L) homogeneização e centrifugação a 5000rpm por 5min. O sobrenadante foi descartado e as lavagens repetidas até a obtenção de um “*pellet*” límpido.

Após a lise das hemácias iniciou-se a extração de DNA de PBMCs conforme o método fenol-clorofórmio. Ao *pellet* celular foi adicionado 300 µL de tampão WCLB (Tris-HCl 100mM pH8, EDTA 50mM pH8, NaCl 500mM, SDS 1%) juntamente com 20 µL de proteinase K (10 mg/mL) (Invitrogen, Life Technologies). A mistura foi

mantida em banho-Maria a 60°C até a completa dissolução do *pellet* celular. Logo após, adicionou-se 500 µL da mistura fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), e centrifugou-se a 12000rpm por 20 minutos. O produto da centrifugação (sobrenadante) foi transferido para novo microtubo, onde foi misturado com 500 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e centrifugado a 12000rpm por 10min. Ao sobrenadante foi adicionado 1mL de etanol absoluto juntamente com 50 µL de acetato de amônio 7,5M. A mistura foi mantida a -70°C por 3 horas para precipitação de ácidos nucleicos.

Decorrido este período, o material foi centrifugado a 12000rpm por 20 min e ao *pellet* foi adicionado 600 µL de etanol 70%, seguido de centrifugação a 12000rpm por 5 min com posterior secagem e ressuspensão do pellet celular em água ultrapura.

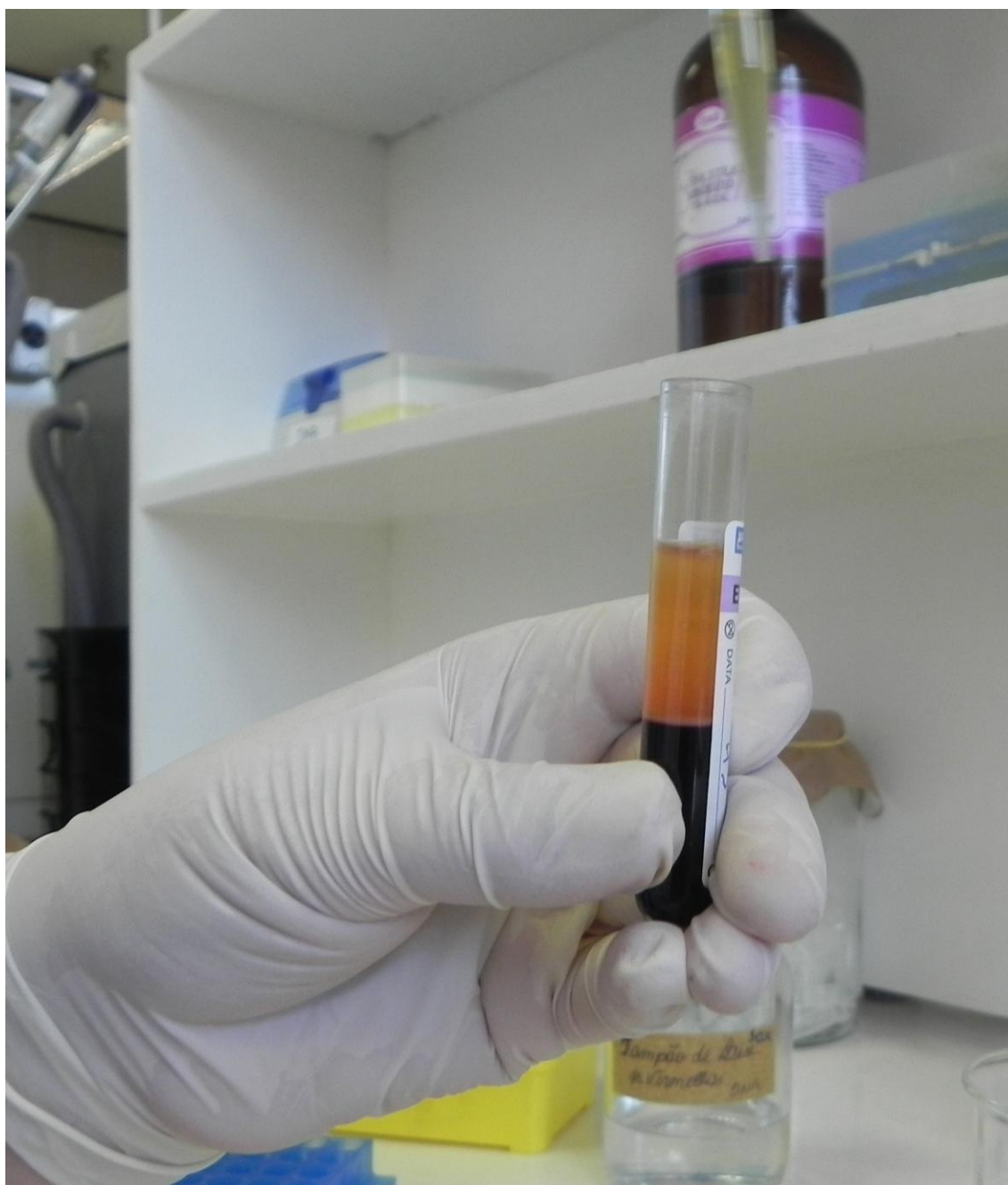


Figura 4: Obtenção da PBMC para da extração do DNA.

3.2.2 Genotipagem do Polimorfismo R577X do gene da *alfa-actinina 3* (*ACTN3*)

A genotipagem do polimorfismo R577X do gene *ACTN3* foi realizada com o uso de sonda do tipo TaqMan, ID rs1815739 (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA). Neste sistema, a sonda marcada com o fluoróforo VIC é capaz de detectar o polimorfismo T (X), enquanto que a sonda marcada com fluoróforo FAM é capacitada a detectar o polimorfismo C (R). O polimorfismo T indica Timina e o

polimorfismo C indica Citosina. Onde a sonda encontrar complementariedade com T, aparecerá fluorescência (ligada a sonda) correspondente ao VIC e quando se ligar ao C a sonda FAM é que fluoresceu. O indivíduo que tem os alelos TT permitirá que se ligue somente a sonda VIC e o TT corresponde ao genótipo XX, quando o indivíduo for CC se ligará a sonda FAM, correspondente ao genótipo RR e quando o indivíduo for heterozigoto irá se ligar ambas as sondas, uma em cada alelo e o indivíduo terá o genótipo RX. As reações foram conduzidas com volume final de 10 μ L. Cada reação continha sonda TaqMan 20x (rs1815739) (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA), 0,25 μ M de dNTPs (Ludwig, Biotec), 3 mM de $MgCl_2$, tampão da PCR 1x (20mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl) e 0,25U de Taq DNA polimerase (Ludwig, Biotec) e 100ng de DNA genômico. Em seguida, as reações de qPCR foram conduzidas em termociclador CFX96 (Bio-Rad), com prévia desnaturação inicial de 95°C por 5 min. seguidas por 40 ciclos de 94°C por 10s, 60°C por 15s, 72°C por 10s. Os dados da genotipagem foram analisados com o software CFX Manager™ 3.0 (Bio Rad).



Figura 5: Equipamento da análise da ACTN3 (termociclador CFX96 Bio-Rad), com amostra.

3.2.3 Genotipagem do Polimorfismo (I/D) do gene da enzima conversora de angiotensina *ECA*

Para análise do polimorfismo da *ECA* (I/D) seguiu-se o estudo realizado por Lindpaintner, K. et al (1995), onde os alelos I e D foram identificados com base na amplificação da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) amplificando os respectivos fragmentos no íntron 16 do gene da *ECA* e fracionando a amostra, sendo que a visualização ocorreu por eletroforese.

As reações de amplificação de um fragmento do intron 16 do gene *ACE* foram realizadas com volume final de 25 µL, utilizando 2,5 µL de tampão de PCR 1x (20mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl) e 0,25U de Taq DNA polimerase (Ludwig, Biotec), 0,25 µM de dNTPs (Ludwig, Biotec), 3 mM de MgCl₂, 0,4 pMoL de cada oligonucleotídeo (hace 3s 5' TGGGACCACAGCGCCCGCCACTAC 3' e hace 3as 5' TCGCCAGCCCTCCCATGCCCATAA 3') e 100ng de DNA genômico. As reações de PCR foram conduzidas em termociclador T100 (Bio-Rad), com prévia desnaturação inicial de 94°C por 5min. seguidas por 35 ciclos de 94°C por 30s, 56°C por 45s, 72°C por 2min., e extensão final de 72°C por 7 min. Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese 1% e as imagens capturados por fotodocumentador Quantum ST4 (Biosystems). Os produtos amplificados referentes aos alelos D e I foram observados pela presença de amplicons de 318pb e 597pb, respectivamente.

Em amostras heterozigotas o alelo D é preferencialmente amplificado e devido a este fato foi realizada uma segunda reação de PCR em todas as amostras dos indivíduos analisados. Nesta etapa foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos hace5a 5' TGGGACCACAGCGCCCGCCACTAC 3' e hace5c 5' TCGCCAGCCCTCCCATGCCCATAA 3' descritos por Lindpaintner et al. (1995). As condições de reação foram às mesmas citadas acima, com exceção da temperatura de anelamento de 67°C. Na presença do alelo I foi observado um único amplicon de 335pb e este mesmo amplicon foi ausente na presença do alelo D em homozigose.

3.3 AVALIAÇÕES FÍSICAS E DE DESEMPENHO ESPORTIVA

3.3.1 AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CORPORAL

A avaliação da Composição Corporal foi realizada por meio do equipamento de câmara pletismográfica (BOD POD *Gold Standard* — Body Composition System Tracking) da marca COSMED. Este modelo, construído de fibra de vidro, contém uma janela de acrílico, com assento em seu interior para o avaliado se acomodar e uma porta com dispositivos eletromagnéticos para seu fechamento. O volume no interior da câmara é de aproximadamente 450 litros e permite ambiente confortável para o avaliado. A câmara foi conectada a um microcomputador que, por intermédio de *software* específico, determina as variações de volumes do ar e da pressão em seu interior, quando desocupada e com o avaliado, e variáveis pulmonares necessárias às estimativas do volume corporal.

Para isso, o aparelho foi calibrado antes das avaliações, utilizando-se cilindro com volume conhecido (50 litros). A balança acoplada ao aparelho também foi aferida, utilizando-se referencial de 20kg. Após esta calibração, os voluntários foram avaliados usando o mínimo de roupa possível. Foi solicitado o uso de touca durante a avaliação com o intuito de prender os cabelos. Cada teste dura, em média, quatro minutos, sendo neste período realizada a medida do volume ocupado pelo voluntário, observando-se o princípio de Boyle. Assim, são medidas as variações entre a pressão e o volume para se determinar a densidade corporal. A partir desses dados, a composição corporal foi mensurada baseada na equação de Siri (1961). Antes de iniciar o teste, os dados do avaliado são incluídos no *software* do equipamento. Imediatamente após este procedimento, o avaliado é pesado na própria balança do equipamento que possui sensibilidade de três casas decimais. Durante todo o teste, o avaliado permaneceu sentado dentro do equipamento e a cada passo da avaliação a porta de pletismografia era aberta para dar seqüência à medida. Para se evitar alterações indesejáveis em relação aos resultados, e conforme já descrito na literatura, durante a avaliação não foi permitido o uso de objetos metálicos como brincos, anéis, correntes, *piercing*, etc.

O equipamento faz a análise da composição corporal do indivíduo, pelo deslocamento do ar. As variáveis utilizadas na avaliação do Bod Pod® são a Densidade (kg/L); a Massa corporal total (kg); a Massa magra (kg); a Massa gorda

(kg); o % de Massa magra; e o % de Massa gorda. Além disso, é possível estimar a Taxa Metabólica Basal e gasto energético diário para indivíduos maiores de 18 anos.



Figura 6: Plestimografia da marca COSMED, BOD POD *Gold Standart* — Body Composition System Tracking System

3.3.2 TESTE EM ESTEIRA ROLANTE (ERGOESPIROMETRIA)

De acordo com Barros Neto, Tebexreni, Tambeiro (2001) a ergoespirometria é uma avaliação de grande aplicação prática tanto para o atleta como para os praticantes de atividade física não competitiva. O teste ergoespirométrico possibilita determinar variáveis respiratórias, metabólicas e cardiovasculares pela medida das

trocas gasosas pulmonares durante o exercício e a expressão dos índices de avaliação funcional. O consumo máximo de oxigênio e o limiar anaeróbico são os principais indicadores de aptidão funcional cardiorrespiratória, sendo utilizados na prática para diagnóstico e prognóstico de desempenho esportivo.

O protocolo utilizado foi do laboratório da Universidade Estadual de Londrina, sendo teste máximo progressivo, onde os primeiros 3 minutos a esteira rolante deverá ter uma velocidade inicial de 7km/h, após os três minutos iniciais houve um incremento de 1km/h a cada minuto, até a exaustão máxima do avaliado. Após o fim do teste, o avaliado retorna a velocidade inicial (7 Km/h) por 3 minutos. A inclinação da esteira foi fixada a 1%. A esteira utilizada foi uma INBRAMED, modelo ATL 10.500, com velocidade máxima de 24 Km/h.

Especificamente para os atletas do ciclismo, o teste de Potência Aeróbia com o equipamento de ergoespirometria foi realizado em Bicicleta Ergométrica, a fim de reproduzir a prática utilizada pelos atletas. Seguindo o protocolo utilizado pelo laboratório foi realizado um teste máximo progressivo onde havia um pré-aquecimento de 3 minutos em que o atleta permanecia a 150W, em uma velocidade constante de 21Km/h, após o terceiro minuto o teste iniciava a 250W e velocidade constante de 21Km/h, com incremento de 50W a cada 1 minuto até a exaustão ou quando o atleta não conseguia manter o mínimo na velocidade estipulada em 21Km/h.

Para esses testes o avaliado utilizou o equipamento para avaliação direta de ergoespirometria K4b2 (COSMED). Esse é um equipamento portátil, pesando em torno de 800 gramas, que transmite dados por telemetria. Tem alcance de aproximadamente 1000 metros e armazena dados no próprio ergoespirômetro e/ou no computador. Esse equipamento realiza medições a cada ciclo respiratório “*breath by breath*”, podendo ser estabelecido um filtro de tempo de acordo com a necessidade para a análise. Especificamente para este estudo, os dados foram filtrados a cada 15 segundos.

Antes da realização da coleta de dados, o ergoespirômetro foi calibrado por meio de quatro procedimentos diferentes: 1) mistura de gases concentrada em cilindro de armazenamento ($O_2 = 16\%$; $CO_2 = 5\%$), 2) volume de ar com três litros estáveis, 3) ar concentrado no ambiente, e 4) volume inspirado e expirado com fluxo e velocidade controlada por sinal sonoro.

A fixação do equipamento no avaliado foi realizada por meio de suporte em forma de colete, o qual é preso, na região frontal do tronco, o ergoespirômetro, e na parte dorsal, uma bateria e uma antena transmissora (telemetria) do sinal referente aos dados coletados, que é enviado para uma base receptora junto ao computador controlador do teste.

O ergoespirômetro possui pneumotacógrafo em máscara que deve ser fixada a cabeça do avaliado, possuindo touca própria do equipamento, permitindo um ajuste adequado e confortável durante a execução do teste.



Figura 7: Teste em Esteira Rolante utilizando o analisador de gases portátil K4b2 (COSMED)

3.3.3 AVALIAÇÃO DE POTÊNCIA DE MEMBROS INFERIORES

Para avaliação de Potência de Membros Inferiores foram realizados 3 tipos de saltos: *Squat Jump*, *Counter movement Jump* e *Counter movement Jump* com auxílio dos membros superiores. Cada salto foi repetido 3 vezes e foi registrada o melhor salto. Entre os saltos havia 1 minuto de intervalo.

Para a execução desses saltos foi utilizada a placa de salto da marca Hidrofit. Este equipamento possui múltiplas aplicações, atendendo à maioria das modalidades esportivas e às várias fases do treinamento.

O Jump Test consiste de uma placa – “plataforma de contato” – medindo 100-66cm (hardware) – sensível à pequenas pressões, de um programa (software) Jump Test 2.0, de um cabo de conexão (interface) e de 25 pinos (porta paralela). O programa permite a realização de testes visando obter dados relacionados aos seguintes parâmetros (gráficos gerados on-line): 1- salto vertical; 2- saltos pliométricos e 3- saltos múltiplos (“endurance” anaeróbia)

Segue abaixo a descrição dos saltos.

SQUAT JUMP: salto vertical partindo da posição de pé com membros inferiores em semiflexão a 90°, sem executar qualquer movimento prévio e as mãos na cintura. O sujeito efetua um salto vertical máximo. Trabalho concêntrico.

COUNTER MOVEMENT JUMP: salto vertical com contra movimento. Da posição de pé, com as mãos na cintura, e mantendo o tronco o mais ereto possível. Descer o corpo flexionando os membros inferiores até quase os 90° seguido imediatamente de um salto vertical máximo. Trabalho concêntrico, precedido por uma atividade excêntrica.

COUNTER MOVEMENT JUMP LIVRE COM AUXÍLIO DOS MEMBROS SUPERIORES: salto vertical com contra movimento. Da posição de pé, com os braços livres permitindo auxílio dos mesmos durante o salto, e mantendo o tronco o mais ereto possível. Descer o corpo flexionando os membros inferiores até quase

90°, seguido imediatamente de um salto vertical máximo. Trabalho concêntrico, precedido por uma atividade excêntrica.



Figura 8: Salto *Squat Jump* em Plataforma.

3.3.4 AVALIAÇÃO DA VELOCIDADE

Para a execução do teste de velocidade foi utilizada o equipamento de célula fotoelétrica, denominado Multi Sprint (Hidrofit). Esse equipamento é um recurso tecnológico que possibilita a avaliação completa da condição física, através de recursos computadorizados. A avaliação física foi realizada através de ferramentas precisas, simples e de baixo custo. As qualidades físicas são mensuradas a partir de parâmetros (tempo, velocidade) em equipamentos desenvolvidos especificamente para este fim.

VELOCIDADE 30m: O teste consiste em realizar o esforço na maior velocidade possível, apenas reduzindo após transcorrer os 30 metros. Havia uma marcação após os 30 metros para que o atleta parasse somente após essa marcação superior aos 30 metros, sendo assim o atleta não reduzia a velocidade antes dos 30 metros. Cada atleta realizou duas tentativas, com intervalo de, no mínimo, cinco minutos entre as tentativas. Registrou-se então, o melhor resultado entre as duas tentativas.

3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi inicialmente desenvolvida por meio da estatística descritiva através de média, desvio padrão, valores mínimos e máximos, seguida por teste de normalidade de *Shapiro Wilks* e *Levene* para testar as hipóteses de distribuição normal e homogeneidade das variâncias, respectivamente. Também foram apresentados valores percentuais dos dados.

Para verificar possíveis associações entre os genótipos da ACTN3 e ECA com a duração do esforço adotou-se o teste de Qui-Quadrado. O teste ANOVA *one way* foi empregado para as comparações entre os genótipos da ACTN3 e ECA e o desempenho motor.

Todas as análises foram realizadas no software SPSS 20.0. Foi considerado o nível de significância de 0,05.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo teve como objetivo identificar a associação dos polimorfismos dos genes da ACTN3 (R577X) e ECA I/D com indicadores do desempenho de atletas classificados de acordo com a duração do esforço. Sendo assim, nesse capítulo serão apresentados os resultados e discussão dos dados.

Pode-se observar através da tabela 3 a distribuição do número de sujeitos que compõe a amostra. O número de sujeitos da amostra apresenta algumas variações, isto é devido a não realização de determinados testes por parte dos mesmos, por inúmeros motivos, tais como: lesão, não comparecimento e outros.

Tabela 3 – Características descritivas ($\bar{x} \pm DP$) dos sujeitos da amostra (Geral).

	n	Média	DP	Mínimo	Máximo
Idade (anos)	176	16,75	3,50	11	35
Peso (Kg)	175	64,65	16,75	29,1	134,8
Estatura (cm)	175	170	11,01	142	196
Massa Magra (%)	163	86,14	8,52	53,4	98,9
Massa Gorda (%)	163	13,87	8,52	1,1	46,6
SJ (cm)	173	29,81	6,78	11,8	49,7
SJPOT (watts)	172	409,72	134,50	147	728
CMJ(cm)	173	32,55	7,49	15,0	53,7
CMJPOT(watts)	172	428,15	142,15	160	769
SCML(cm)	173	38,18	8,69	16,8	57,7
SCMLPOT(watts)	172	464,52	153,04	161	819
Velocidade (seg)	138	4,75	0,45	4,06	6,09
VO _{2máx} (ml/kg/min)	168	43,46	8,40	23,0	67,2

Na tabela 3 observa-se que a média de idade dos sujeitos desse estudo ($16,75 \pm 3,50$ anos) diferencia-se do estudo de Kikuchi et al (2012;2013) com japoneses da luta Greco Romana, onde a média de idade foi de $24,2 \pm 4,1$ para atletas de nível internacional e $19,7 \pm 1,26$ para atletas de nível nacional. Rodriguez-Romo et al (2013) analisou judocas espanhóis de 18 a 75 anos.

A pesquisa realizada por Rodriguez-Romo et al (2010) e Santiago et al (2010) com 214 homens e 67 mulheres saudáveis, apresentou dados médios independente do gênero de variáveis motoras de *Squat Jump* (SJ) de $37,1 \pm 0,5$ cm, *Counter*

Movement Jump (CMJ) de $38,4 \pm 0,5$ cm e tempo no teste de velocidade de 30 metros de $4,55 \pm 0,02$ seg, todos os valores superiores ao encontrado no presente estudo ($29,81 \pm 6,78$ cm, $32,55 \pm 7,49$ cm e $4,75 \pm 0,45$ seg, respectivamente).

Na tabela 4 são apresentadas as características descritivas masculina e feminina.

Tabela 4 – Características descritivas ($\bar{x} \pm DP$) da amostra separadas por gênero.

	Genêro	n	Média	DP	Mínimo	Máximo
Idade (anos)	M	99	17,13	4,06	12	35
	F	77	16,26	2,54	11	24
Peso (Kg)	M	98	69,6	16,10	34,3	117,9
	F	76	58,26	15,44	29,1	134,8
Estatura (cm)	M	98	174,92	10,41	143	193
	F	76	164,61	8,88	142	196
Massa Magra(%)	M	91	89,28	7,03	63,3	98,9
	F	72	82,17	8,63	53,4	97,6
Massa Gorda (%)	M	91	10,73	7,03	1,1	36,7
	F	72	17,83	8,63	2,4	46,6
SJ (cm)	M	98	32,81	5,92	21,6	49,7
	F	75	25,89	5,80	11,8	40,7
SJ POT (watts)	M	98	454,72	127,30	177	728
	F	75	350,11	120,51	147	645
CMJ(cm)	M	98	36	6,59	21,3	53,7
	F	75	28,04	6,08	15	46,7
CMJ POT(watts)	M	98	476,41	134,97	186	769
	F	75	364,23	125,94	160	672
SCML(cm)	M	98	42,19	7,45	20,4	57,7
	F	75	32,93	7,32	16,8	54,7
SCML POT(watts)	M	98	515,32	143,25	211	819
	F	75	397,24	139,82	161	736
Velocidade (seg)	M	82	4,54	0,34	4,06	5,52
	F	56	5,07	0,43	4,36	6,09
VO _{2máx} (ml/kg/min)	M	94	45,25	7,89	27,2	67,2
	F	74	41,20	8,54	23	60,5

Em um estudo realizado por Zhao et al (2003) com associação da ECA com VO_{2máx}, avaliaram um grupo de 67 homens militares com idade de $23,21 \pm 0,29$ anos, peso corporal de $65,62 \pm 0,98$ Kg, estatura de $172 \pm 0,01$ cm. Esse estudo corrobora com a proximidade dos valores médios encontrados no atual estudo em relação ao peso corporal e estatura dos homens. O valor médio do VO_{2máx} encontrado nos chineses foi de $52,63 \pm 1,58$ ml/Kg/min, acima dos valores encontrados no presente estudo.

Na pesquisa de Gineviciene et al (2011) foram avaliados 193 atletas Lituaneos com idade de $22,00 \pm 6,30$ anos, no qual 152 eram masculinos e 41 eram femininos. A estatura média do estudo da Lituânia foi $179,00 \pm 9,20$ cm para masculino e $173,00 \pm 9,40$ cm para feminino. Em relação ao peso corporal o resultado de

Gineviciene et al (2011) foi de $75,60 \pm 15,20$ Kg para masculino e $66,70 \pm 10,80$ Kg para o feminino. Observa-se uma semelhança para a característica da amostra no gênero masculino com o atual estudo. Para o gênero feminino no estudo de Gineviciene et al (2011) tem estatura e peso superior ao presente estudo ($164,61 \pm 8,88$ cm e $58,26 \pm 15,44$ Kg).

Em um estudo realizado na Polônia de Holdys, Krycsiak e Gronek (2011) com 154 sujeitos masculino e 85 sujeitos do gênero feminino, no qual foi analisado a ACTN3 em relação à aptidão física através do VO_{2max} , a amostra apresentou idade média de $21,40 \pm 1,67$ anos para feminino e $20,90 \pm 2,12$ anos para masculino, peso corporal de $59,70 \pm 5,71$ Kg e $76,20 \pm 8,14$ Kg, estatura de $169,40 \pm 6,28$ cm e $180,30 \pm 10,58$ cm, feminino e masculino, respectivamente.

Em relação à potência de membros inferiores estudos como de Micheli et al (2011) observaram em atletas de futebol o valor médio de SJ de 33,6 cm superior aos encontrados nesse estudo. Os valores de CMJ foram de 36,46 cm, coincidindo com os valores encontrados nesse estudo para a amostra masculina.

Outra variável analisada no presente estudo foi o consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}), e que comparando com o estudo de Sonna, et al (2001) em um grupo do exército americano para mulheres foi de $39,70 \pm 1,0$ ml/kg/min no pré-teste e de $42,20 \pm 0,9$ ml/kg/min no pós-teste verificando similaridade com o presente estudo ($41,20 \pm 8,54$). Ainda no mesmo estudo os valores encontrados para a amostra masculina foi de $50,5 \pm 1,2$ ml/kg/min no pré-teste e de $52,31,3$ ml/kg/min no pós-teste mostrando ser superior ao encontrado nesse estudo ($45,25 \pm 7,89$ ml/kg/min).

Outro estudo que apresentou indicadores de VO_{2max} foi de Holdys, et al (2001), que encontrou valores de $45,47 \pm 6,47$ ml/Kg/min para feminino e $55,41 \pm 7,32$ para masculino, aproximados com o presente estudo para a amostra feminina e valores mais elevados do estudo de Holdys et al (2011) para amostra masculina.

Ainda como caracterização da amostra, a tabela 5 descreve os dados gerais da frequência genotípica do ACTN3 e ECA dos atletas divididos por modalidades.

Tabela 5 – Frequência genotípica do ACTN3 e da ECA em relação à distribuição por esporte (Geral).

Esporte	n	Genótipo ACTN3, n (%)			n	Genótipo ECA, n (%)		
		RR	RX	XX		DD	DI	II
Atletismo	47	15 (31,91)	27 (57,44)	5 (10,64)	47	15 (31,91)	26 (55,31)	6 (12,77)
Esp. Quadra	24	7 (29,16)	10 (41,66)	7 (29,16)	25	12 (48)	11 (44)	2 (8)
Canoagem	5	3 (60)	2 (40)	—	5	2 (40)	—	3 (60)
Ciclismo	11	1 (9,09)	8 (72,72)	2 (18,18)	10	4 (40)	3 (30)	3 (30)
Ginástica	12	3 (25)	5 (41,6)	4 (33,3)	12	6 (50)	6 (50)	—
Lutas	28	8 (28,57)	12 (42,86)	8 (28,57)	28	10 (35,71)	9 (32,14)	9 (32,14)
Aquáticos	17	3 (17,64)	8 (47,06)	6 (35,29)	17	4 (23,53)	10 (58,82)	3 (17,64)
Raquete	22	5 (22,73)	12 (54,54)	5 (22,73)	23	5 (21,74)	11 (47,83)	7 (30,43)
Volei Praia	8	2 (25)	5 (62,5)	1 (12,5)	8	1 (12,5)	4 (50)	3 (37,5)

Na tabela 5, verifica-se similaridade entre os genes da ACTN3 e da ECA em percentuais. Por exemplo, no atletismo temos 31,91% atletas RR e 31,91% atletas DD, 57,44% atletas RX e 55,31% atletas DI, 10,64% atletas XX e 12,77% atletas II.

De acordo com estudo realizado com atletas japoneses de luta Greco-Romana (n=135), o genótipo da ACTN3 apresenta valores percentuais de RR=28,00%, RX=50,00% e XX=22,00% (Kikuchi et al, 2013; Kikuchi et al, 2012), bem próximos aos encontrados nesse estudo que foram de 28,57% para o gene RR, 42,86% para RX e 28,57% para XX. Outro estudo realizado com judocas espanhóis (n=108) a distribuição genotípica para a ACTN3 foi RR=22,30%, RX=54,60% e XX=23,10% (Rodrigues-Romo et al, 2013). Tanto nos três estudos citados como o presente estudo o maior percentual em lutadores está no gene RX, o que colabora com a literatura que o gene predominante em lutadores é o que caracteriza a potência (RR e RX).

Roth et al (2008) analisaram 75 fisiculturista com o genótipo ACTN3 e verificaram percentual de 38,10% para RR, 45,60% para RX e 16,30 para XX, apresentando também maior percentual para o gene RX. Saunders, et al (2007) avaliaram 457 atletas de triathlon especialistas nas provas curtas, médias e longas do esporte, e encontrou frequência de genótipos de RR=35,50%, RX=45,80% e XX=18,00% para os atletas do *fast triathlon*, similar ao encontrado por Lucia et al (2006) em corredores de endurance de nível olímpico, com valores de RR=25,00%, RX=57,70% e XX=17,30%, e a distribuição de todos os genótipos da ACTN3 foram próximos dos relatados por Yang et al (2003) que mostraram RR=31,00%, RX=45,00% e XX=24,00%.

Estudo com o genótipo da ACTN3 em corredores africanos de endurance mostrou que para Etíopes (n=76) os resultados do percentual dos genes são RR=46,00%, RX=46,00% e XX=8,00%, para Quenianos (n=284) os valores são RR=75,00%, RX=24,00% e XX=1,00%, e para corredores de potência Nigrianos (n=62) são RR=87,00%, RX=13,00% e XX=0%. Esses resultados mostram que para os corredores de endurance da África a prevalência dos genes RR e RX são superiores ao XX, contradizendo os estudos onde relacionam o gene XX com o desempenho de endurance (YANG et al, 2007).

Na Rússia, Ahmetov, et al (2007) avaliaram 456 atletas de diferentes modalidades com o genótipo da ACTN3 apresentando valores gerais de RR=39,30%, RX=55,00% e XX=5,70%. Os resultados por esporte são apresentados a seguir: Biatlhon (n=40) RR=42,50%, RX=55,00% e XX=2,50%; Esqui Cross-Country (n=98) RR=45,90%, RX=49,00% e XX=5,10%; Marcha atlética (n=21) RR=33,30%, RX=52,40% e XX=14,30%; Ciclismo de estrada (n=34) RR=47,10%, RX=52,90% e XX=0%; Remo (n=187) RR=32,10%, RX=62,60% e XX=5,30%; Natação de 800metros a 25 km (n=42) RR=52,40%, RX=30,90% e XX=16,70%; Triatlhon (n=34) RR=35,30%, RX=64,70% e XX=0%. No atual estudo foi encontrado percentuais para o ciclismo (n=11) de RR=9,09%, RX=72,72% e XX=18,18%, mostrando prevalência para o gene RX assim como no estudo de Ahmetov, et al (2007), e para natação e triatlhon RR=17,64%, RX=47,06% e XX=35,29%, resultados que mostram alguma discordância com o relatado no estudo russo.

Em relação ao gene da ECA (I/D), Wang et al (2012) avaliaram nadadores asiáticos e europeus caucasianos com o genótipo da ECA com os seguintes resultados para os europeus caucasianos (n=200) DD= 28,80%, DI=47,00% e II=24,20% e para os asiáticos (n=326) os resultados foram DD=7,50%, DI=49,40% e II=43,10%, apresentando prevalência para o gene RX assim como no presente estudo (DD=23,53; DI=58,82% e II=17,64%)

Em estudo realizado com atletas turcos não-elite (n=88) com o genótipo da ECA apresentou valores de DD=38,60%, DI=40,90% e II=20,50% (Cam et al, 2005) mostrando uma concentração maior no gene DD e DI, assim como no presente estudo, o que sugere maior predominância para esportes de potência/velocidade

De acordo com a tabela 6, homens e mulheres foram analisados separadamente em função das conhecidas influências específicas do gênero em relação às medidas de desempenho motor.

Foi verificado em estudo com lutadores os valores dos genes da ACTN3 para o gênero masculino (n=94) de 18% para RR, de 57% para RX e de 25% para XX e no feminino (n=149) de 20% para RR, de 48% para RX e de 32% para XX (Kikuchi et al (2013). Em relação ao presente estudo, estes resultados apresentam semelhança quanto a prevalência dos genes RR e RX nos lutadores tanto no masculino quanto no feminino (35% RR, 35% RX, 30%XX masculino e 12,5% RR, 62,5% RX e 25% XX, feminino).

Tabela 6 - Frequência genotípica masculina e feminina do ACTN3 e da ECA em relação à distribuição por esporte.

Esporte	Gênero	Genótipo ACTN3, n (%)			Genótipo ECA, n (%)		
		RR	RX	XX	DD	DI	II
Atletismo	M	7 (28)	15 (60)	3 (12)	7 (28)	13 (52)	5 (20)
	F	8 (36,36)	12 (54,55)	2 (9,09)	8 (36,36)	13 (59,09)	1 (4,55)
Esp.Quadra	M	3 (21,43)	6 (42,85)	5 (35,71)	9 (60)	6 (40)	—
	F	4 (40)	4 (40)	2 (20)	3 (30)	5 (50)	2 (20)
Canoagem	M	3 (60)	2 (40)	—	2 (40)	—	3 (60)
	F	—	—	—	—	—	—
Ciclismo	M	—	3 (75)	1 (25)	3 (75)	1 (25)	—
	F	1 (14,28)	5 (71,43)	1 (14,28)	1 (16,66)	2 (33,33)	3 (50)
Ginástica	M	—	3 (100)	—	1 (33,33)	2 (66,66)	—
	F	3 (33,33)	2 (22,22)	4 (44,44)	5 (55,55)	4 (44,44)	—
Lutas	M	7 (35)	7 (35)	6 (30)	8 (40)	7 (35)	5 (25)
	F	1 (12,5)	5 (62,5)	2 (25)	2 (25)	2 (25)	4 (50)
Aquáticos	M	2 (22,22)	4 (44,44)	3 (33,33)	3 (33,33)	4 (44,44)	2 (22,22)
	F	1 (12,5)	4 (50)	3 (37,5)	1 (12,5)	6 (75)	1 (12,5)
Raquete	M	3 (20)	9 (60)	3 (20)	5 (31,25)	6 (37,5)	5 (31,25)
	F	2 (28,57)	3 (42,86)	2 (28,57)	—	5 (71,43)	2 (28,57)
Volei Praia	M	1 (33,33)	1 (33,33)	1 (33,33)	—	1 (33,33)	2 (66,66)
	F	1 (20)	4 (80)	—	1 (20)	3 (60)	1 (20)
Total	M	26 (26,53)	50 (51,02)	22 (22,44)	38 (38)	40 (40)	22 (22)
	F	21 (27,63)	39 (51,31)	16 (21,05)	21 (28)	40 (53,33)	14 (18,66)

O estudo de Massida et al (2009) com atletas de ginástica artística (n=17) apresentou valores do gene ACTN3 para o gênero masculino de 58,8% para RR, 41,1% para RX e 0% para XX, concordando com o presente estudo em 0% para o gene XX. No presente estudo, a ginástica artística masculina foi 100% para RX, havendo similaridade em relação ao gene XX com o estudo de Massida et al (2009)

onde há ausência total para esse gene, mostrando predominância para a potência na ginástica artística.

Lucia et al (2006) avaliaram 50 ciclistas de endurance masculino e encontraram valores de 28% para RR, 46% para RX e 26% para XX. Apesar de o presente estudo avaliar apenas 4 indivíduos, não foi encontrado gene RR (0%), os valores para RX e XX foram 75% e 25%, respectivamente. Os percentuais encontrados para o gene XX nesse estudo é bem próximo dos valores encontrado no estudo citado.

Holdys et al (2011b) realizaram estudo com atletas de diversas modalidades na Polônia e encontraram valores do genótipo da ECA para o gênero masculino (n=154) de DD=25,32%, DI=46,75% e II=27,92% e para o gênero feminino (n=85) valores de DD=27,05%, DI=45,89% e II=27,05%.

Em virtude de a amostra ser composta por atletas de níveis de desempenho diferentes, mostrou-se a necessidade de apresentar os dados descritivos e a frequência genotípica, diferenciando os atletas de acordo com nível (escolar, nacional e internacional). Dessa forma, segue a tabela 7 com os dados categorizados por nível de desempenho.

Tabela 7 – Característica descritiva da amostra categorizada por nível de desempenho.

	Genêro	n	Escolar	n	Nacional	n	Internacional
Idade (anos)	M	77	15,65±1,71 ^a	15	21±4,45 ^b	7	25,14±,74 ^c
	F	54	15,52±1,99 ^a	17	18±2,69 ^b	6	18±3,63 ^b
Peso (Kg)	M	77	67,51±16,29	15	75,30±15,24	7	80,25±10,43
	F	54	54,64±14,55	17	64,95±22,86	6	62,16±5,12
Estatura (cm)	M	77	1,74±0,11	15	1,77±0,08	7	1,80±0,04
	F	54	1,64±0,09	17	1,66±0,08	6	1,63±0,04
Massa Magra(%)	M	70	87,73±12,41	14	89,97±5,18	7	90,94±3,73
	F	49	73,98±24,96	17	74,54±21,71	6	78,13±5,39
Massa Gorda (%)	M	70	12,28±12,42	14	10,02±5,19	7	9,05±3,73
	F	49	24,39±23,26	17	19,63±11,67	6	21,86±5,39
SJ (cm)	M	77	32,21±5,84 ^a	15	33,38±5,81 ^{a,b}	6	38,98±3,78 ^b
	F	52	30,16±32,54	17	27,09±7,13	6	24,06±3,93
SJ POT (watts)	M	77	441,71±131,28	15	484,73±98,76	6	546,67±98,24
	F	52	338,25±126,76	17	393,41±113,89	6	328,17±38,11
CMJ(cm)	M	77	35,32±6,66 ^a	15	36,48±5,30 ^{a,b}	6	43,53±3,78 ^b
	F	52	28,05±6,16	17	28,88±6,47	6	25,58±4,02
CMJPOT(watts)	M	77	462,62±140,08	15	506,47±96,55	6	578,17±104,80
	F	52	352,73±132,67	17	407,18±119,13	6	340,33±42,51
SCML(cm)	M	77	41,49±7,66 ^a	15	42,57±5,45 ^{a,b}	6	50,25±3,90 ^b
	F	52	32,79±7,40	17	34,43±7,23	6	29,88±6,87
SCMLPOT(watts)	M	77	500,66±148,55	15	548,93±108,39	6	619,33±100,44
	F	52	383,82±145,55	17	447,88±134,72	6	367,83±62,23
Velocidade (seg)	M	65	4,57±0,35	12	4,47±0,26	5	4,30±0,16
	F	43	5,03±0,39	9	5,13±0,55	4	5,34±0,51
VO ₂ máx (ml/kg/min)	M	74	45,57±7,74	14	43,28±9,64	6	44,70±5,78
	F	47	41,44±8,71	17	40,84±9,45	4	39,58±5,80

Os dados estão descritos por média±dp. Comparação usando teste de Bonferroni. Letras diferentes apresentam diferenças significativas. Valores de p<0,05.

Os resultados acima expostos mostram que houve diferença significativa no gênero feminino apenas para a variável idade. Essa diferença ocorreu no nível escolar com nacional (p=0.001) e no nível escolar com internacional (p=0.043), não havendo diferença comparando nacional com internacional. Para todas as outras variáveis para gênero feminino não houve diferença entre os níveis.

Para o gênero masculino a variável idade apresentou diferença significativa em todos os níveis, escolar com nacional (p=0.000), escolar com internacional (p=0.000) e nacional com internacional (p=0.006). As variáveis relacionadas com salto/potência medidas em cm (*Squat Jump* (SJ), Counter movement (CMJ) e Counter movement Livre (CMJL)) apresentaram diferenças significativas apenas quando comparado o nível escolar com o nível internacional (SJ p=0.020; CMJ p=0.009 e CMJL p = 0.016).

Na tabela 8 são apresentados às frequências genotípicas de acordo com o nível de desempenho dos atletas.

Tabela 8 – Frequência genotípica do ACTN3 e da ECA categorizados por nível de desempenho.

	Nível de Desempenho	n	Genótipo ACTN3, n (%)			p	n	Genótipo ECA, n (%)			p
			RR	RX	XX			DD	DI	II	
Masculino	Escolar	76	21 (27,63)	37 (48,68)	18 (23,68)	1,000	77	28 (36,36)	33 (42,85)	16 (20,78)	0,660
	Nacional	15	06 (40,00)	06 (40,00)	03 (20,00)		15	06 (40,00)	04 (26,66)	05 (33,33)	
	Internacional	06	01 (16,66)	04 (66,66)	01 (16,66)		07	04 (57,41)	02 (28,57)	01 (14,28)	
Feminino	Escolar	54	15 (27,77)	32 (59,26)	07 (12,96)	1,000	54	16 (26,63)	26 (48,15)	12 (22,22)	0,792
	Nacional	17	04 (23,53)	07 (46,66)	06 (35,29)		16	04 (25,00)	11 (68,75)	01 (6,25)	
	Internacional	06	02 (33,33)	02 (33,33)	02 (33,33)		6	1 (16,66)	4 (66,66)	01 (16,66)	

Qui-quadrado $p < 0.05$

De acordo com os resultados obtidos categorizando o nível de desempenho, observa-se que não houve associação nem para o gênero masculino nem para o gênero feminino, entre o nível de desempenho e os genótipos da ACTN3 ($p=1.000$ e $p=1.000$, respectivamente masculino e feminino) e ECA ($p=0.660$ e $p=0.792$, respectivamente).

Kikuchi, et al (2013) analisando lutadores japoneses de nível internacional e nacional com o genótipo da ACTN3 apresentaram uma frequência genotípica de 27% para RR, 62% para RX e 11% para XX para o nível internacional e 29% para RR, 43% para RX e 28% para XX para o nível nacional. Esses valores apresentaram prevalência para o gene RX no estudo de Kikuchi et al (2013) e no presente estudo. Em relação ao nível nacional os valores do presente estudo foram 40%, 40% e 20%, respectivamente para RR, RX e XX, mostrando valores iguais para os genes RR e RX.

O estudo de Kikuchi et al (2012) analisou lutadores japoneses com o genótipo da ECA e obteve os seguintes valores para o nível internacional DD=59%, DI=29% e II=12%, cujo valores são aproximados com o presente estudo de DD=57,41%, DI=28,57% e II=14,28%. Para o nível nacional os valores de Kikuchi et al (2012) foram DD=44%, DI=29% e II=27% e os valores do presente estudo foram DD=40%, DI=26,66% e II=33,33%.

A distribuição por esporte realizada nesse estudo não contempla as diferentes provas do atletismo, natação, ciclismo, canoagem e diferentes tipos de lutas, por esse motivo optou-se também por fazer a distribuição por duração do evento.

Abaixo a tabela 9 com a frequência genotípica de todos os atletas em relação à distribuição por duração do evento. Foi realizado o teste estatístico Qui-Quadrado para verificar se existe associação entre os genótipos e a duração do evento.

Tabela 9 - Frequência genotípica geral do ACTN3 e da ECA em relação à distribuição por duração do esforço.

Duração do Esforço	n	Genótipo ACTN3, n (%)			n	Genótipo ECA, n (%)		
		RR	RX	XX		DD	DI	II
Endurance	33	7 (21,21)	20 (60,60)	6 (18,19)	32	11 (34,38)	15 (46,87)	6 (18,75)
Pot./Vel.	61	16 (26,23)	33 (54,10)	12 (19,67)	62	24 (38,71)	31 (50,00)	7 (11,29)
Mista	80	24 (30,00)	36 (45,00)	20 (25,00)	81	24 (29,63)	34 (41,98)	23 (28,39)

Qui-quadrado $p < 0.05$. ACTN3 vs. Duração do Esforço $p = 0.709$; ECA vs. Duração do Esforço $p = 0.140$.

Já foi demonstrado que muitas variantes que tem uma associação significativa com o desempenho físico podem não necessariamente ter a mesma associação em outros estudos. Fenótipos que estão relacionados com o desempenho da potência foram analisados para criar uma cadeia de evidências ligando os polimorfismos estudados com o sucesso nos esportes de potência (Gineviciene et al, 2011).

No presente estudo não foram encontradas associações entre os genótipos da ACTN3 ($p = 0.709$) e ECA ($p = 0.140$) em relação à duração do esforço. Os genes RX e DD foram mais comuns entre os atletas de “endurance”. Para os atletas de potência/velocidade os genes mais comuns foram o RX e DD, com um percentual alto quando somados RR+RX (80,33%) e DD+DI (88,71%), pois apesar desse estudo não apresentar associação entre os genes e a duração do evento, vários estudos já relacionaram os genótipos da ACTN3 XX e da ECA I/I aos eventos de “endurance” e os genótipos da ACTN3 RR e RX e da ECA D/D e D/I aos eventos de potência e velocidade. (Montgomery, Marshall et al., 1998; Gayagay et al., 1998; Myerson, Hemingway et al., 1999; Collins, Xenophontos et al., 2004; Clarkson et al., 2005; Moran et al., 2007; Vicent et al., 2007; MacArthur et al., 2008; Shenoy, Tandon et al., 2010).

No estudo realizado na Lituania com 193 atletas e 250 pessoas saudáveis (grupo controle), Gineviciene, et al (2011) mostraram que o polimorfismo da ECA D/I foi significativamente diferente entre os atletas e grupo controle ($p = 0.034$), bem como comparando o genótipo da ECA no grupo de atletas de potência e controle ($p = 0.019$). O gene DD foi mais comum entre os atletas de “endurance” (31,20%) do que os atletas de potência (19,60%). Para o genótipo da ACTN3 não houve

diferença significativa na frequência genotípica entre o grupo controle e os atletas, também não havendo diferenças entre as durações do evento.

Outro estudo que teve como objetivo associar a frequência genotípica com o desempenho específico da ginástica foi de Massida et al (2009), especificamente o genótipo da ACTN3, mostrando que há diferença significativa quando comparados ao grupo controle ($p=0.031$). Os ginastas apresentaram baixa frequência do gene XX (2,80%), para os genes RR e RX os valores foram iguais de 48,50% para cada gene.

Wang, et al (2013) mostraram que o polimorfismo da ECA D/I está associado com nadadores de elite tanto caucasianos como do leste asiático. A associação não é vista em eventos de longa duração em cada grupo, mas apenas em nadadores de curta e média distância caucasianos e somente em nadadores de curta distância no leste asiático. Para o genótipo ACTN3 não foi encontrada associação significativa com nenhuma amostra desse estudo.

A observação de que o alelo D foi associado com nadadores de curta e média distância caucasianos, enquanto o alelo I foi associado com curta distância com nadadores do leste asiáticos é particularmente notável. O padrão de associação da ECA D/I entre os grupos étnicos que se observou no estudo de Wang et al (2013) está de acordo com relatórios anteriores baseados em estudos de outros eventos esportivos.

Estudos anteriores, embora usando amostras menores, relataram associações entre o alelo D e a elite da natação em curta e média distância em Caucasianos (Woods et al, 2001; Costa et al, 2009). A direção do efeito do leste asiáticos é consistente com relatos anteriores sobre ECA que afeta outros esportes relacionados com a energia de “endurance”, da mesma forma como faz com a natação, o alelo D foi relatado para ser associado com o desempenho de “endurance” na maratona japonesa em corredores de elite (Tobina et al, 2010), enquanto que o alelo I tem sido relatada como sendo associado com atletas de elite de potência em coreanos (KIM et al, 2010).

A tabela 10 está de acordo com o objetivo específico do presente estudo, que é identificar a frequência genotípica dos polimorfismos da ACTN3 (R577X) e ECA I/D em atletas classificados de acordo com a duração do esforço e gênero.

Tabela 10 – Frequência genotípica masculina e feminina do ACTN3 e da ECA em relação à distribuição por duração do esforço.

Duração do Esforço	Gênero	n	Genótipo ACTN3, n (%)			n	Genótipo ECA, n (%)		
			RR	RX	XX		DD	DI	II
Endurance	M	17	3 (17,65)	11 (64,7)	3 (17,65)	17	6 (35,29)	8 (47,06)	3 (17,65)
	F	16	4(25)	9 (56,25)	3 (18,75)	15	5 (33,33)	7 (46,66)	3 (20)
Pot./Vel.	M	27	6 (22,22)	16 (59,26)	5 (18,52)	28	12 (42,86)	12 (42,86)	4 (14,28)
	F	34	10 (29,41)	17(50)	7 (20,59)	34	12 (35,3)	19 (55,88)	3 (8,82)
Mista	M	54	17 (31,48)	23 (42,59)	14 (25,92)	55	20 (36,36)	20 (36,36)	15 (27,27)
	F	26	7 (26,92)	13 (50)	6 (23,08)	26	4 (15,38)	14 (53,85)	8 (30,77)

Qui-quadrado $p < 0.05$. ACTN3 vs. Duração do Esforço - Feminino $p = 0.937$; Masculino $p = 0.679$.
 ECA vs. Duração do Esforço – Feminino $p = 0.157$; Masculino $p = 0.657$.

Foi identificado que para o gênero masculino e o genótipo ACTN3 em relação às três durações de esforços houve como prevalência o gene RX (64,70%; 59,26% e 42,59%), respectivamente para “endurance”, potência/velocidade e mista. O teste estatístico não apresentou associação ($p = 0.679$), mas verifica-se prevalência dos genes RR e RX para a duração de potência/velocidade e duração mista conforme encontrado nesse estudo.

Ainda em relação ao gênero masculino, mas com o genótipo ECA houve prevalência para os genes DD e DI nas três durações de esforços (“endurance” (35,29% e 47,06%), potência/velocidade (42,86% e 42,86%) e mista (36,36% e 36,36%)), mostrando novamente a mesma relação mostrada anteriormente com o gene ACTN3, onde os esforços de potência/velocidade e mista correspondem ao encontrado na literatura caracterizado pela deleção da ECA (D). Não houve associação entre a ECA e a duração de esforço determinado estatisticamente ($p = 0.657$).

Para o gênero feminino também não houve associação entre duração do esforço e o genótipo da ACTN3 ($p = 0.937$) e para genótipo da ECA ($p = 0.157$). Mas os dois genótipos tiveram prevalência para gene RR/RX (25% e 56,25%; 29,41% e 50%; 26,92% e 50%, respectivamente RR/RX e “endurance”, potência/velocidade e mista) e DD/DI (33,33% e 46,66%; 35,50% e 55,88%, respectivamente DD/DI, “endurance” e potência/velocidade). Apenas para a duração de esforço mista feminina que a prevalência foi para DI e II (53,85% e 30,77%).

Em estudo pioneiro Yang, et al (2003) avaliaram 429 atletas de elite em 14 esportes diferentes e classificaram os atletas em velocidade e “endurance”. Os resultados encontrados para velocistas masculino foram RR=53%, RX=39% e

XX=8% e para velocistas feminino encontraram RR=43%, RX=57% e XX=0%. Em relação à “endurance” o estudo citado encontrou para o gênero masculino valores de RR=28%, RX=52% e XX=20%, já para o gênero feminino os valores foram RR=36%, RX=35% e XX=29%.

Comparando o estudo de Yang et al (2003) com o presente estudo verifica-se que para “endurance” masculina, há prevalência da frequência do gene RX para os dois estudos e quando somados os valores de RR+RX obtêm valores similares de 80% para Yang et al e 82,35% para o presente estudo. Já para a mesma variável “endurance”, mas para o gênero feminino não há similaridade entre os genes.

Em um estudo de Lucia et al (2006) com 50 ciclistas masculino de “endurance” apresentou valores de RR=28%, RX=46% e XX=26%, apresentando também prevalência do gene RX. E quando somados RR+RX (74%) o valor fica próximo ao presente estudo e ao estudo de Yang et al (2003).

Holdys et al (2011a) também identificaram o genótipo ACTN3 em atletas (masc=119 e fem=37) de diferentes modalidades e subdividiu os esportes por duração do evento. Os resultados encontrados para gênero masculino e “endurance” foram RR=30,30%, RX=57,57% e XX=12,12%, para potência/velocidade foram RR=58,33%, RX=33,33% e XX=8,33% e para os eventos mistos os valores foram RR=44,44%, RX=39,68% e XX=14,28%. A prevalência no estudo de Holdys et al (2011a) está em RR e RX em todas as categorias de duração do evento, assim como no presente estudo

Para o gênero feminino o estudo de Holdys et al (2011a) mostraram valores para “endurance” de RR=35,29%, RX=41,17% e XX=23,52%, para potência/velocidade RR=54,54%, RX=27,27% e XX=18,18% e para eventos mistos os valores foram RR=44,44%, RX=44,44% e XX=11,11%. A prevalência para o gênero feminino é a mesma que para o gênero masculino (RR+RX), corroborando com o presente estudo.

Saunders et al (2007) verificaram em triatletas masculinos da África do sul o genótipo da ACTN3 dividido em 3 tipos de provas, *fast Triathlon*, *Midlle Triathlon* e *Long Triathlon* e encontraram os seguintes resultados: Fast triathlon RR= 35,50%; RX: 47,40%; XX: 17,10%, Middle triathlon valores aproximados (apenas mostra em gráfico e não coloca o valor real) de RR=37%, RX=42% e XX=17%, e para Long Triathlon valores aproximados de RR= 32%, RX=43% e XX=23%.

Em relação ao gene da ECA, outro estudo de Holdys et al (2011b) analisou o polimorfismo da ECA de atletas em relação ao nível de aptidão física (VO_{2max}) de diferentes modalidades e subdividiu os esportes por duração do evento (masc=119 e fem=37). Os resultados encontrados foram para o gênero masculino e “endurance” foram DD=30,30%, DI=42,42% e II=27,27%, para potência/velocidade foram DD=25%, DI=58,33% e II=16,66% e para os eventos mistos os valores foram DD=22,58%, DI=46,77% e II=30,65%. Em todas as categorias de duração do evento no estudo de Holdys et al (2011b) houve uma prevalência para o gene DI. No presente estudo há prevalência para o gene DI apenas para “endurance”, nos eventos mistos e potencia/velocidade os genes DD e DI foram iguais em percentuais.

Para o gênero feminino o mesmo estudo de Holdys et al (2011b) indicou valores para “endurance” de DD=5,88%, DI=41,17% e II=52,94%, para potência/velocidade DD=54,54%, DI=27,27% e II=18,18% e para eventos mistos os valores foram DD=0%, DI=66,66% e II=33,33%. Houve uma prevalência para “endurance” no gene II, corroborando com a literatura de que em atletas de “endurance” há prevalência para o gene II, o que não ocorreu no presente estudo, onde valores percentuais de “endurance” para o mesmo gene foi de 20%.

No presente estudo verifica-se para o gênero masculino predominância dos genes DD e DI para as durações de esforço de potência/velocidade e mista, concordando com estudos que o alelo D tem associação com modalidades como corridas de velocidade, natação de curta distância e esportes de força predominantemente do metabolismo anaeróbio (Montgomery et al, 1998; Jones et al, 2002; Thompson et al, 2006; Costa et al, 2009; Holdys et al, 2011b).

Da mesma forma acontece com o gênero feminino para a duração de potência/velocidade com predominância dos genes DI e DD, mas para a duração mista apenas 15,38% representa DD e 53,85% representa DI, e para o gene II o percentual é de 30,77%. Para a duração do esforço denominada “endurance”, em ambos os gêneros apenas 3 atletas (17,65% masculino e 20% feminino) apresentaram o gene II.

Para identificar o segundo objetivo específico do estudo que é verificar a associação entre os polimorfismos ACTN3 e ECA I/D com as características morfológicas e de desempenho motor de atletas classificados de acordo com a

duração do esforço, segue a tabela 11 e a tabela 12 apresentando a associação do genótipo da ACTN3 e ECA, respectivamente com as variáveis de desempenho motor separados por gênero.

Tabela 11 – Associação do genótipo ACTN3 com as variáveis do desempenho motor.

		RR		RX		XX		F	p
		Média	DP	Média	DP	Média	DP		
FEMININO	SJ (cm)	26,6	5,2	25,1	6,0	26,9	6,0	0,155	0,857
	SJPOT (w)	338	126	352	101	361	159	0,016	0,984
	CMJ (cm)	28,2	5,6	27,4	6,5	29,4	5,7	0,026	0,975
	CMJPOT (w)	349	133	368	107	376	161	0,005	0,995
	SCML (cm)	32,8	7,5	32,3	7,5	34,8	6,8	0,084	0,919
	SCMLPOT (w)	380	147	401	121	410	177	0,004	0,996
	Velocidade (seg)	5,06	0,44	5,03	0,35	5,16	0,56	0,356	0,702
	VO _{2max} (ml/kg/min)	41,9	7,8	39,4	8,8	44,6	8,1	2,158	0,126
MASCULINO	SJ (cm)	32,1	5,1	33,0	6,5	33,4	5,9	0,773	0,465
	SJPOT (w)	464	143	443	133	471	103	0,524	0,595
	CMJ (cm)	35,1	5,3	35,8	7,1	37,6	6,8	1,138	0,326
	CMJPOT (w)	487	154	461	140	499	108	0,777	0,463
	SCML (cm)	41,1	6,4	42,4	7,4	43,1	8,7	0,944	0,393
	SCMLPOT (w)	528	167	502	148	532	110	0,492	0,614
	Velocidade (seg)	4,60	0,30	4,54	0,32	4,52	0,43	0,269	0,765
	VO _{2max} (ml/kg/min)	42,9	8,8	45,9	7,0	45,6	7,3	0,161	0,852

Anova One way. $p < 0.05$

De acordo com a análise estatística não houve associação de nenhuma variável de desempenho motor com os genes da ACTN3 tanto para o gênero masculino como para o gênero feminino.

No presente estudo, para o gênero masculino os atletas XX tiveram valores superiores nos testes relacionados com potência (saltos verticais – SJ, CMJ e SCML) tanto medidos em cm como em watts e no teste de velocidade de 30 metros. Para o teste de VO_{2max} os valores de RX e XX estão muito próximos (45,90 e 45,60, respectivamente) e foram mais altos do que o gene RR.

Em relação ao gênero feminino as atletas genotipadas como XX tiveram melhor desempenho nos testes de salto vertical, mas para velocidade de 30 metros os melhores resultados foram para o gene RR e RX, com predominância para RX. Já para o teste VO_{2max} que caracteriza o desempenho aeróbio, o melhor resultado foi para o gene XX. Lembrando que mesmo com resultados superiores, não houve diferença significativa entre os genes e o desempenho motor.

Como hipótese em vários estudos o déficit da proteína ACTN3 pode representar uma vantagem para atletas de “endurance”, enquanto a presença da ACTN3 no músculo tem conferido um efeito positivo em atletas de velocidade, potência e força em ambos os sexos (Paparini et al, 2007; Massida et al, 2009). Mas

há estudos controversos como de Lucia et al (2007) que documenta um estudo de caso de um atleta espanhol de elite no salto em distância genotipado como XX, assim como Drushevskaya, et al (2008) observou um atleta russo, recordista mundial do lançamento de martelo também genotipado com XX. Yang, et al (2007) encontrou predominância em corredores fundistas africanos genes RR e RX, com valores muito inferiores para XX (1%).

No estudo de Gineviciene et al (2011) que associou genótipo da ACTN3 com desempenho motor encontrou associação em homens e mulheres em relação a preensão manual com a mão direita e esquerda para o genótipo homozigoto RR ($p < 0.01$). Para o teste de potência utilizando o salto vertical os mesmos autores encontraram valores superiores para os atletas com gene XX quando comparados com atletas RR e RX.

Em um estudo de Holdys et al (2011a) com o objetivo de comparar o genótipo ACTN3 com o metabolismo aeróbio por meio do VO_{2max} não encontrou associação entre os valores médios do VO_{2max} e os genes RR, RX e XX tanto em homens como em mulheres. Para o autor existe uma tendência para homens com o gene XX em obter valores maiores do consumo máximo de oxigênio em relação aos outros genes da ACTN3. O fato de que os maiores valores de consumo máximo de oxigênio são registrados para os indivíduos com o genótipo XX, que é caracterizada por uma falta de ACTN3 em fibras musculares, é consistente com o mecanismo de desenvolvimento da condição física para o tipo aeróbico no caso de uma falta de predisposição para gerar alta potência pelos músculos, o que foi proposto por MacArthur et al (2007)

A distribuição genotípica da ACTN3 em estudos comparativos de Yang et al (2007) em maratonistas africanos (quenianos e etíopes) e velocistas nigerianos apresentaram uma frequência muito baixa do alelo X em quenianos (1%) e nigerianos (0%) e mais elevado em etíopes (12%), o que não corresponde ao maior número elevado de atletas de “endurance” na África. Os autores concluíram que a falta do genótipo da ACTN3 não é a causa primária para a conhecida alta capacidade de “endurance” dos africanos. Nesse mesmo estudo, não foi encontrado nenhum (0%) atleta de potência com o gene XX nos nigerianos.

O estudo de Lucia et al (2006), grupo de ciclista de elite não confirmou a diferença na distribuição genotípica entre o grupo de atleta e controle. Além disso,

valores de VO_{2max} relatados entre os genes da ACTN3 individual dos ciclistas não foram significantes.

Yang, et al (2007) indicaram que é possível que o efeito do genótipo da ACTN3 no desempenho muscular é dependente de outras influências genéticas, ou variáveis ambientais, que pode diferir entre a população.

Em estudo com 701 triatletas da África do Sul que completaram a prova do Ironman em 2000 e 2001, Saunders et al (2007) tiveram como objetivo investigar a associação da ACTN3 com o desempenho. Não houve diferença entre o genótipo da ACTN3 e os três grupos de Triatletas (*Fast Triathlon*, *Midlle Triathlon* e *long Triathlon*) em nenhuma variável de desempenho estudada, como por exemplo, tempo total de prova ($p=0.411$), tempo de natação ($p=0.305$), tempo de bicicleta ($p=0.317$) e tempo de corrida ($p=0.442$).

A primeira publicação de estudo caso-controle apresentou que a frequência da ACTN3 para o genótipo XX foi alta em atletas de “endurance” na Austrália comparado com o grupo controle, embora tenha sido significativa apenas para as mulheres (Yang et al, 2003). No entanto a hipótese de que a deficiência da ACTN3 (XX) pode ter algumas vantagens no desempenho de “endurance” não tem sido encontrado por alguns estudos com atletas de elite finlandeses, espanhóis, etíopes, kenianos, italianos e caucasianos (Niemi et al, 2005; Lucia et al, 2006; Yang et al, 2007; Paparini et al, 2007; Saunders et al, 2007). Ao contrário Gomez-Gallego et al (2008) relatou que ciclistas profissionais de estrada com o gene RR e RX tem significativamente maior pico de produção de potência e limiar ventilatório do que ciclistas com gene XX.

O presente estudo não mostrou associação com o desempenho motor em nenhum dos gêneros e genes estudados, mas está de acordo com alguns estudos acima citados que também não apresentam associação (Niemi et al, 2005; Lucia et al, 2006; Yang et al, 2007; Paparini et al, 2007; Saunders et al, 2007).

Abaixo segue a tabela 12 com a associação dos valores de desempenho motor e os genótipos da ECA (DD, DI e II)

Tabela 12 – Associação do genótipo ECA com as variáveis do desempenho motor ($\bar{x} \pm DP$).

		DD		DI		II		F	P
		Média	DP	Média	DP	Média	DP		
FEMININO	SJ (cm)	25,8	5,6	26,6	6,5	23,9	3,9	1,282	0,286
	SJPOT (w)	357	138	354	120	314	83	0,065	0,937
	CMJ (cm)	27,8	5,9	28,9	6,7	25,9	4,2	1,760	0,182
	CMJPOT (w)	369	145	369	124	329	94	0,042	0,959
	SCML (cm)	32,7	6,6	34,1	8,2	29,9	5,2	1,918	0,157
	SCMLPOT (w)	403	158	404	140	353	98	0,095	0,909
	Velocidade (seg)	5,13	0,45	5,00	0,43	5,18	0,42	1,068	0,351
	VO _{2máx} (ml/kg/min)	40,4	9,6	41,4	8,4	41,8	8,2	0,887	0,418
MASCULINO	SJ (cm)	34,0	6,2	32,6	5,7	31,1	5,5	1,587	0,211
	SJPOT (w)	475	134	442	126	443	120	0,369	0,693
	CMJ (cm)	37,3	6,9	35,8	6,3	34,0	6,2	1,916	0,154
	CMJPOT (w)	498	144	462	130	463	129	0,433	0,650
	SCML (cm)	43,7	7,1	41,9	7,4	40,1	7,9	1,982	0,145
	SCMLPOT (w)	538	148	499	138	503	145	0,473	0,625
	Velocidade (seg)	4,47	0,27	4,55	0,37	4,67	0,37	1,994	0,143
	VO _{2máx} (ml/kg/min)	45,2	8,1	44,3	7,0	47,0	9,1	1,459	0,239

Anova One way. $p < 0.05$.

Os dados apresentados na tabela 12 mostram que não houve associação do genótipo da ECA (DD, DI e II) para nenhuma variável do desempenho motor, nem para o gênero feminino nem para o masculino.

Para o gênero feminino os melhores resultados das variáveis de salto vertical (cm e watts) e velocidade são as atletas que tem o gene DD e DI, com prevalência para o DI. Para a variável VO_{2máx}, que tem por característica o desempenho de “endurance”, a melhor média foi para o gene II e DI.

No gênero masculino as variáveis de potência em cm e em watts tiveram prevalência para o gene DD. Para a variável velocidade a prevalência do melhor desempenho foi para o gene DD, seguido pelo DI. Em relação ao VO_{2máx} o melhor resultado de desempenho foi para II, apesar de muito próximo os valores.

Apesar dos dados do presente estudo não apresentarem associação estatística com o desempenho para o genótipo da ECA, os dados seguem com valores de prevalência conforme está descrito na literatura em que gene II está associado com aspectos do desempenho de “endurance” (Bray et al, 2009; Ahmetov et al, 2009; Gineviciene et al, 2011). Assim como, alguns estudos têm mostrado que o alelo D está sendo associado com a força e o volume de massa muscular e aumento no percentual de fibras musculares de contração rápida. Portanto, o alelo D foi associado com atletas de elite de potência. (Ahmetov et al, 2006, 2007, 2008 e 2009; Gineviciene et al, 2011)

Algumas investigações não têm encontrado associação do genótipo da ECA com força isométrica e dinâmica (Pescatello et al, 2006; Ahmetov et al, 2009).

Segundo Gineviciene et al (2011) nenhum estudo tem examinado a influência do genótipo da ECA na velocidade e propriedades contráteis do músculo esquelético em humanos, o que é de interesse dado a influência do genótipo da ECA na composição do tipo de fibra muscular.

Holdys et al (2011b) associaram o genótipo da ECA com valores de VO_{2max} em atletas de diferentes modalidades e não apresentaram associação entre os valores médios do VO_{2max} e os genótipos da ECA (DD, DI e II), tanto para o gênero feminino como para o masculino. Nos dois gêneros os resultados apresentaram uma prevalência para o gene DI.

Para Lucia et al (2005) o alelo D foi encontrado em maior quantidade entre os ciclistas de longa duração do que em outros atletas de “endurance” de elite, esse achado pode estar relacionado com a necessidade de potência anaeróbia no ciclismo, mesmo para longa duração, pois os ciclistas necessitam do sistema anaeróbio no final de prova.

Em estudos iniciais as associações da ECA com diferentes fenótipos de desempenho foram demonstrada com tipos de esporte específicos. Um excesso do alelo I foi relatado em remadores australianos (Gayagay et al, 1998), em atletas de “endurance” russos (Nazarov et al, 2001), em ciclistas de elite de longa distância (Alvarez et al, 2000), corredores de longa distância olímpicos da Grã-Bretanha (Myerson et al, 1999), em nadadores de longa distância comparados com curta distância (Tsianos et al, 2004) e triatletas de Ironman da África do Sul (fast triathlon) (Collins et al, 2004).

Estudos apontam que alguns pesquisadores não têm encontrado a confirmação da associação do gene ECA com o VO_{2max} , ou mesmo capaz de encontrar um efeito geral para o metabolismo aeróbio (Thompson et al, 2006; Papadimitriou et al, 2009; Woods et al, 2009; Scott et al, 2010; Ash, et al 2011, Holdys et al, 2011b). Mas modelos genéticos incluindo vários polimorfismos estão sendo estudados de modo a formar um perfil característico ótimo para atletas praticantes de esportes de que exige um específico tipo de metabolismo do exercício (HOLDYS et al, 2011b).

De acordo com Gineviciene et al (2011) alguns laboratórios sugerem testes genéticos para a escolha de uma carreira esportiva apropriada, o genótipo da ACTN3 não garante a capacidade de uma pessoa para ser atleta de elite. Os testes

para jovens atletas de acordo com o polimorfismo ACTN3, não é suficiente para a escolha de um tipo de esporte. Testar uma combinação de polimorfismos parece ser muito mais eficaz ao combinar, por exemplo, o ACTN3 com polimorfismos da ECA ou a adição de alguns outros candidatos a polimorfismo do gene para a combinação.

Com base nos resultados do presente estudo e da literatura mundial, acredita-se que são necessários outros candidatos a polimorfismos para a combinação de genes na determinação da escolha de um tipo de esporte, como por exemplo C34T do gene *AMP deaminase* (*AMPD1*) e o polimorfismo 985+185/1170 do gene *creatina quinase M* (*CKM-M*).

Com participação no desempenho físico encontra-se a isoforma do gene *AMP deaminase*, o *AMPD1* presente em fibras musculares, cujo produto funcional é denominado de mioadenilato deaminase. Durante contrações musculares intensas e de curta duração, a demanda de ATP excede a capacidade potencial da célula em suprir a ressíntese desta molécula (Rico-San, et al. 2003). Outra variante genética envolvida no desempenho muscular é encontrada no gene que codifica a isoforma muscular da creatina quinase MM (*CKM-M*), responsável pela rápida regeneração de ATP durante contrações musculares intensas. Echegaray e Rivera, (2001) demonstraram associação significativa entre variações na sequencia gênica *CKM-M* com aumento cardiorrespiratório seguido por consumo máximo de oxigênio, após 20 semanas de treinamento.

5. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo apresentam a necessidade de mais pesquisas genéticas relacionada com o esporte, para que no futuro possa contribuir com técnicos que tenham dados genéticos de seus atletas para a determinação da modalidade ou prova em que os atletas jovens irão se inserir, pois o estudo mostrou que há uma prevalência para os genes RR e RX, DD e DI que correspondem à potência/velocidade na duração de esforço para as provas/modalidades que também correspondem à potência/velocidade e para os eventos com a utilização da energia aeróbia e anaeróbia, como por exemplo, os esportes de quadra.

Em relação ao gênero e o desempenho físico, o gênero feminino teve melhores resultados das variáveis de salto vertical (cm e watts) e velocidade com as atletas que tem o gene DD e DI, com prevalência para o DI. Para a variável VO_{2max} , que tem por característica o desempenho de “endurance”, a melhor média foi para o gene II e DI. Em relação ao genótipo da ACTN3 as atletas genotipadas como RR e RX XX tiveram melhor desempenho em velocidade de 30 metros. Para o teste VO_{2max} o melhor resultado foi para o gene XX. Apesar de ocorrer uma prevalência em relação aos genes, não houve associação entre os genes e o desempenho motor para o gênero feminino.

Para o gênero masculino houve melhores resultados no desempenho de salto (potência) e velocidade para os atletas genotipados como XX, e para o VO_{2max} os melhores resultados foram para o gene RX e XX com valores próximos. Para o genótipo ECA, o desempenho em potência e velocidade teve como prevalência o gene DD e DI e para o VO_{2max} melhor resultado para o gene II, apesar de muito próximos nos três genes. Da mesma forma que no feminino, não houve associação entre os genes e o desempenho motor para o gênero masculino.

Tanto para o gênero feminino como para o masculino, acredita-se que a não associação pode ter ocorrido pelo fato de que na amostra havia atletas de diferentes níveis de desempenho e a vários esportes.

Neste estudo pode-se concluir que não foram encontradas associações entre os genótipos da ACTN3 e ECA em relação à duração do esforço. Os genes RX e DD foram mais comuns entre os atletas de “endurance”. Para os atletas de

potência/velocidade os genes mais comuns foram o RX e DD, com um percentual alto quando somados RR+RX e DD+DI.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Ahmetov, I.I., Astratenkova, I.V., Druzhevskaya, A.M., Komkova, A.I., Liubaeva, E.V., Tarakin, P.P., et al. (2006) The association of gene polymorphisms with the muscle fibre type composition. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova*. 92:883–888.

Ahmetov, I.I., Druzhevskaya, A.M., Astratenkova, I.V., Popov D.V., Vinogradova, O.L., Rogozkin, V.A. (2007) The ACTN3 R577X polymorphism in Russian endurance athletes. *Br. J. Sports Med*. 44: 649-652.

Ahmetov, I.I., Popov, D.V., Astratenkova, I.V., Druzhevskaya, A.M., Missina, S.S., Vinogradova, O.L., Rogozkin, V.A. (2008) The Use of Molecular Genetic Methods for Prognosis of Aerobic and Anaerobic Performance in Athletes. *Hum. Physiol*. **34**(3): 338–334.

Ahmetov, I.I. and Rogozkin, V.A. (2009). Genes, athlete status and training. In Genetics and Sports. *Med. Sport Sci*. 54: 43-71

Alberts, B. Johnson, A., Lewis J., Raff, M., Roberts, K. and Walte, P. *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Publishing, 2007.

Almeida, J. A. et al. (2012) A influência do genótipo da ECA sobre a aptidão cardiovascular de jovens do sexo masculino moderadamente ativos. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 98 (4): 6.

Alvarez, R., Terrados, N., Ortolano, R., Iglesias-Cubero, G., Reguero, J.R., et al.(2000). Genetic variation in the renin-angiotensin system and athletic performance. *Eur. J. Appl. Physiol*. 82:117–20

Amir, O. et al. (2007) The ACE deletion allele is associated with Israeli elite endurance athletes. *Exp Physiol*. 92 (5): 881-886.

Ash G.I., Scott R.A., Deason M., Dawson T.A., Wolde B., Bekele Z. et al. (2011) No Association between ACE Gene Variation and Endurance Athlete Status in Ethiopians. *Med Sci Sports Exerc*, 43 (4): 590–597.

Barros Neto, T.L., Tebexreni, A.S. e Tambeiro, V.L. (2001) Aplicações Práticas da Ergoespiometria no Atleta. *Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo* 11 (3), 695-705.

Beggs A.H., Byers T.J., Knoll J.H., Boyce F.M., Bruns G.A., Kunkel L.M. (1992) Cloning and characterization of two human skeletal muscle alpha-actinin genes located on chromosomes 1 and 11. *J Biol Chem* 26, 9281-9288.

Beunem G & Thomis M (2000) Muscular strenght development in children and adolescents. *Pediatric Exercise Science* 12, 174-197.

Beunem G & Thomis M (2004) Gene powered? Where to go from heritability (h^2) in muscle strength and power? *Exercise and Sport Science Reviews* 32, 148-154.

Bray M.S. (2000) Genomics, genes, and environmental interaction: the role of exercise. *J Appl Physiol* 88: 788-792.

Bray MS, Hagberg JM, Perusse L, Rankinen T, Roth SM, Wolfarth B & Bouchard C (2009) The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2006-2007 update. *Med Sci Sports Exerc* 41, 35-73.

Brull, D. et al. (2001) Bradykinin B2BKR receptor polymorphism and left-ventricular growth response. *Lancet*. 358 (9288), 1155-1156.

Brutsaert T.D., Parra E.J. (2006) What makes a champion? Explaining variation in human athletic performance. *Respir Physiol Neurobiol* 151: 109-123.

Bueno Jr C.R. e Pereira MG (2010) Biologia molecular como ferramenta no esporte de alto rendimento: possibilidades e perspectivas. *Ver. Bras. Cienc. Esporte* 31(3), 231-249.

Calò, C.M., Vona, G. (2008) Gene polymorphism and elite athletic performance. *J Anthropol Sci*. 86:113-131.

Carmelli, D. & Reed, T. (2000) Stability and change in genetic and environmental influences and hand-grip strength in older male twins. *J Appl Physiol* 89, 1879-1883.

Cam, F.S., Colakoglu, M., Sekuri, C., Colakoglu, S., Sahan, Ç. And Berdeli, A. (2005) Association Between the ACE I/D Gene Polymorphism and Physical Performance in a Homogeneous Non-Elite Cohort. *Can. J. Appl. Physiol.* 30(1): 74-86.

Chan S, Seto J.T., MacArthur D.G., Yang N., North K.N., Head S.I. (2008) A gene for speed: contractile properties of isolated whole EDL muscle from an alpha-actinin-3 knockout mouse. *Am J Physiol Cell Physiol* **295**:C897–C904.

Chanock S.J., Manolio T., Boehnke M., Boerwinkle E., Hunter D.J., Thomas G., Hirschhorn J.N., Abecasis G., Altshuler D., Bailey-Wilson J.E., Brooks L.D., Cardon L.R., Daly M., Donnelly P., Fraumeni J.F., Jr., Freimer N.B., Gerhard D.S., Gunter C., Guttmacher A.E., Guyer M.S., Harris E.L., Hoh J., Hoover R., Kong C.A., Merikangas K.R., Morton C.C., Palmer L.J., Phimister M.G., Rice J.P., Roberts J., Rotimi C., Tucker M.A., Vogan K.J., Wacholder S., Wijsman E.M., Winn D.M. & Collins F.S. (2007) Replicating genotype-phenotype associations. *Nature* **447**, 655-660.

Cieszczyk P, Krupecki K, Maciejewska A, Sawczuk M. (2009) The angiotensin converting enzyme gene I/D polymorphism in polish rowers. *Int J Sports Med.* **30**:624–627.

Clarkson PM, Devaney JM, Gordish-Dressman H, Thompson PD, Hubal MJ, Urso M, Price TB, Angelopoulos TJ, Gordon PM, Moyna NM, Pescatello LS, Visich PS, Zoeller RF, Seip RL & Hoffman EP (2005) ACTN3 genotype is associated with increases in muscle strength in response to resistance training in women. *J Appl Physiol* **99**, 154-163.

Collins M, Xenophontos SL, Cariolou MA, Mokone GG, Hudson DE, Anastasiades L, et al. (2004) The ACE gene and *endurance performance* during the south african ironman triathlons. *Med Sci Sports Exerc.* **36**:1314-1320.

Costa, A.M., Silva, A.J., Garrido, N.D., Louro, H., Oliveira, R.J., Breitenfeld, L. (2009) Association between ACE D allele and elite short distance swimming. *Eur J Appl Physiol.* **106**(6):785–90.

Day, S. et al. (2007) No correlation between circulating ACE activity and VO₂max or mechanical efficiency in women. *European Journal of Applied Physiology.* **99** (1), 11-18.

De Bosscher, V., Shibli, S.; Van B.M.; De Knop, P., Truynes, J. (2010) Developing a method for comparing the elite sport systems and policies of nations: a mixed research methods approach. *Journal of Sport Management* **24** (5): 567-600.

Delmonico M.J., Kostek M.C., Doldo N.A., Hand B.D., Walsh S., Conway J.M., Carignan C.R., Roth S.M. Hurley B.F. (2007) Alpha-actinin-3 (ACTN3) R577X polymorphism influences knee extensor peak power response to strength training in older men and women. *J Gerontol Biol Sci Med Sci* **62**: 206-212.

Dias R.G., Pereira A.C., Negrão C.E., Krieger J.E. (2007) Polimorfismos geneticos determinantes da performance fisica em atletas de elite. *Rev Bras Med Esporte* 13: 209-216.

Dias R.G. (2011) Genética, performance física humana e doping genético: o senso comum versus a realidade científica. *Rev Bras Med Esporte* 17: 62-70.

Digel, H.A. (2002) The context of talent identification and promotion: A comparison of nations. *New Studies in Athletics* 17 (3/4): 13-26.

Druzhevskaya, A.M., Ahmetov, I.I., Astratenkova, I.V. & Rogozkin, V.A. (2008). Association of the ACTN3 R577X polymorphism with power athlete status in Russians. *European Journal of Applied Physiology* 103, 631–634.

Eynon, N., Duarte, J.A., Oliveira, J., et al. (2009a). ACTN3 R577X polymorphism and Israeli top-level athletes. *International Journal of Sports Medicine* 30, 695–698.

Eynon, N., Alves, A.J., Yamin, C., Duarte, J.A., Oliveira, J., Ayalon, M. et al (2009b). Is there a ACE ID – ACTN3 R577X Polymorphisms Interaction that Influences Sprint Performance? *Int. J Sports Med.* 30: 888-891.

Eynon, N., Ruiz, J.R., Femia, P., Pushkarev, V.P., et al (2012) The ACTN3 R577X Polymorphism across Three Groups of Elite Male European Athletes. *Plos One*. 7(8): 01-07.

Folland J, Leach B, Little t, Hawker K, Myerson S, Montgomery H, et al. (2000) Angiotensin converting enzyme genotype affects the response of human skeletal muscle to functional overload. *Exp Physiol.* 85:575–579.

Gayagay G, Yu B, Hambly B, Boston T, Hahn A, Celermajer DS, et al. (1998) Elite *endurance* athletes and the ACE I allele-the role of genes in athletic *performance*. *Hum Genet.* 103:48-50.

Gentil P., Lima R.M., Lins T.C., Abreu B.S., Pereira R.W. & Oliveira R.J. (2007) Physical Activity, Cdx-2 Genotype, and BMD. *Int J Sports Med* 28 (12), 1065-1069.

Gentil PRVG (2010) Adaptações neuromusculares do exercício resistido: Influência da variação R577X do gene alfa actina 3. *Tese de Doutorado do Programa de Pós Graduação da Universidade de Brasília (UnB)*.

Gineviciene, V., Pranculis, A., Jakaitiene, A., Milasius, K., Kucinskas, V. (2011) Genetic Variation of the Human ACE and ACTN3 Genes and Their Association With Functional Muscle Properties in Lithuanian Elite Athletes. *Medicina (Kaunas)* 47 (5), 284-290.

Gordon, S. E. et al. (2001) ANG II is required for optimal overload-induced skeletal muscle hypertrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 280 (1) 150-159.

Gómez-Gallego F., Santiago C., González-Freire M., Muniesa C.A., Fernández M., Pérez M., Foster C., Lucia A.(2009) Endurance performance: genes or gene combinations? *Int. Jour. Spor. Med.* **30**: 66–72.

Holdys, J., Krysciak, J., Stanislawski, D. and Gronek, P. (2011a) Polymorphism Of The α -Actn3 Gene In Individuals Practising Different Sports Disciplines. *Biol. Sport.* 28: 101-106.

Holdys, J., Krysciak, J., Stanislawski, D. and Gronek, P. (2011b) ACE I/D Gene Polymorphism In Athletes Of Various Sports Disciplines. *Human Movement.* 12(3): 223-231.

INBAR, O. et al. (1996) The Wingate anaerobic test. Champaign, IL: Human Kinetics.

Jones, A.; Montgomery, H. E.; Woods, D. R. (2002) Human performance: a role for the ACE genotype? *Exerc Sport Sci Rev.* 30 (4) 184-190.

Jones, A.; Woods, D. R. (2003) Skeletal muscle RAS and exercise performance. *Int J Biochem Cell Biol.* 35 (6) 855-866.

Juffer P, Furrer R, González-Freire M, Santiago C, Verde Z, Serratosa L, et al. (2009) Genotype distributions in top-level soccer players: A role for ACE? *Int J Sports Med.* 30:387–392.

Kaplan JM, Kim SH, North KN, Rennke H, Correia LA, Tong HQ, Mathis BJ, Rodriguez-Perez JC, Allen PG, Beggs AH, and Pollak MR. (2000) Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet* 24: 251–256.

Kikuchi, N., Min, S., Ueda, D., Igawa, S and Nakazato, K. (2012) Higher Frequency of the ACTN3 R Allele + ACE DD Genotype in Japanese Elite Wrestlers. *J. Strength. Cond. Res.* 26 (12): 3275-3280.

Kikuchi, N., Ueda, D., Min, S., Nakazato, K. and Igawa, S. (2013) The ACTN3 XX Genotype's Underrepresentation in Japanese Elite Wrestlers. *Int. J. Sports Physiol. Perform.* 8 (1): 57-61.

KIM, C.H., Cho J.Y., Jeon J.Y., et al. (2010) ACE DD genotype is unfavorable to Korean short-term muscle power athletes. *International Journal of Sports Medicine*, 31: 65-71.

Lindpaintner, K., Pfeffer, M.A., Kreutz, R., Stampfer, M.J., Grodstein, F., LaMotte, F., Buring, J. and Hennekens, C.H. (1995) A prospective evaluation of an angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease. *The New England Journal Of Medicine*, 332 (11): 706-711.

Linnemann A., Van Der Vena P.F., Vakeel P., Albinus B. (2010) The sarcomeric Z-disc component myopodin is a multiadapter protein that interacts with filamin and alpha-actinin. *European Journal of Cell Biology* 89, 681–692.

Lins T.C., Nogueira L.R., Lima R.M., Gentil P., Oliveira R.J. & Pereira R.W. (2007) A multiplex single-base extension protocol for genotyping Cdx2, FokI, BsmI, Apal and TaqI polymorphisms of the vitamin D receptor gene. *Genet Mol Res* 6, 216–224.

Loos, R, Thomis M, Maes HH, Beunen G, Claessens AL, Derom C, Legius E, Derom R & Vlietinck R. (1997) Gender-specific regional changes in genetic structure of muscularity in early adolescence. *J Appl Physiol* 82, 1802–1810.

Lucía A, Gómez-Gallego F, Chicharro JL, Hoyos J, Celaya K, Córdova A, et al. (2004) Is there an association between ACE and CKMM polymorphisms and cycling performance status during 3-week races? *Int J Sports Med*. 25:442–447.

Lucia, A., Gomez-Gallego, F., Chicharro, J.L., Hoyos, J., Celaya, K., et al. (2005). Is there an association between ACE and CKMM polymorphisms and cycling performance status during 3-week races? *Int. J. Sports Med*. 26: 442–47

Lucia A., Gómez-Gallego F., Santiago C. (2006) ACTN3 genotype in professional endurance cyclists. *Int. Jour. Sport Med*. 27, 880–884.

Lucia, A., Oivan, J., Gómez-Gallego F., et al (2007) Citius and longius (faster and longer) with no alpha-actinin-3 in skeletal muscles? *Br. J. Sports Med*. 41: 616–617.

Lucía A, Morán M, Zihong H, Ruiz JR. (2010) Elite athletes: Are the genes the champions? *Int J Sports Physiol Perform*. 5:98–102.

Ma, F., Yang, Y., Li, X., Zhou, F., Gao, C., Li, M., Gao, L. (2013) The Association of Sport Performance with ACE and ACTN3 Genetic Polymorphisms: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Plos One* 8 (1): e54685. Doi:10.1371/journal.pone.0054685.

MacArthur D.G., North K.N. (2004) A gene for speed? The evolution and function of α -actinin-3. *BioEssays* 26, 786–795.

MacArthur D.G., North K.N. (2005) Genes and human elite athletic performance. *Hum Genet* 116, 331–339.

MacArthur D.G. and North K.N. (2007) ACTN3: A genetic influence on muscle function and athletic performance. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 35(1), 30-34.

MacArthur, D.G., Seto, J.T., Raftery, J.M., Quinlan, K.G., et al. (2007) Loss of ACTN3 gene function alters mouse muscle metabolism and shows evidence of positive selection in humans. *Nat. Genet.* 39:1261-1265.

MacArthur D.G., Seto, J.T., Chan, S., Quinlan, K.G., Raftery, J.M., Turner, N., Nicholson M.D., Kee, A.J., Hardeman E.C., Gunning, P.W., Cooney, G.J., Head, S.I., Yang, N & North, K.N. (2008) An Actn3 knockout mouse provides mechanistic insights into the association between alpha-actinin-3 deficiency and human athletic performance. *Hum. Mol. Genet.* 17, 1076–1086.

MacArthur D.G. and North K.N. (2011) The ACTN3 Gene and Human Performance. In Book: Genetic and Molecular Aspects of Sports Performance. Claude Bouchard and Eric P. Hoffman. *Chapter 18*, 204-214.

Maes H.H., Beunen, G.P., Vlietink, R.F., Neale, M.C., Thomis, M., Vanden E.B., Lysens, R., Simons, J., Derom, C & Derom, R. (1996) Inheritance of physical fitness in 10-yr-old twins and their parents. *Med Sci Sports Exerc* 28, 1479-1491.

Massidda, M., Vona, G. and Calò, C.M. (2009) Association Between the ACTN3 R577X Polymorphism and Artistic Gymnastic Performance in Italy. *Genet Test Mol Biomarkers.* 13 (3): 377-380.

McCauley T., Mastana S.S., Hossack J., Macdonald M., Folland J.P. (2009) Human angiotensin-converting enzyme i/d and alpha-actinin 3 r577x genotypes and muscle functional and contractile properties. *Exp Physiol* **94**: 81–89.

McCauley T., Mastana S.S. and Folland J.P. (2010) ACE I/D and ACTN3 R/X polymorphisms and muscle function and muscularity of older Caucasian men. *Eur. J. Appl. Physiol* 109: 269 – 277.

Meira, T.B., Mazzei, L., Bastos, F.C., Bohme, M.T.S. (2012) Programas de Desenvolvimento de Talentos Esportivos nas Pesquisas Comparativas Internacionais Sobre Esporte de Alto Rendimento e na Realidade Brasileira. *R. Min. Educ. Fis. Viçosa* 20 (2): 37 – 72.

Micheli, M. L. et al. (2011) Angiotensin-converting enzyme/vitamin D receptor gene polymorphisms and bioelectrical impedance analysis in predicting athletic performances of Italian young soccer players. *J Strength Cond Res.* 25 (8), 2084-2091.

Mills M., Yang N., Weinberger R., Vander Woude D.L., Beggs A.H., Eastal S. & North K. (2001) Differential expression of the actin-binding proteins, alpha-actinin-2 and-3 in different species: implications for the evolution of functional redundancy. *Hum Mol Genet* 10, 1335-1346.

Miller S.A., Dykes D.D. & Polesky H.F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res.* 16, 1215.

Myerson S, Hemingway H, Budget R, Martin J, Humphries S, Montgomery H. (1999) Human angiotensin I–converting enzyme gene and *endurance performance*. *J Appl Physiol.* 87:1313–1316.

Montgomery H.E, Marshall R, Hemingway H, Myerson S, Clarkson P, Dollery C, et al. (1998) Human gene for physical *performance*. *Nature* 393:221–222.

Montgomery, H.E., et al. (1997) Association of angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism with change in left ventricular mass in response to physical training. **Circulation.** 96 (3), 741-747.

Moran C.N., Yang N., Bailey M.E., Tsiokanos A., Jamurtas A., MacArthur D.G., North K., Pitsiladis Y.P. Wilson R.H. (2007) Association analysis of the ACTN3 R577X polymorphism and complex quantitative body composition and performance phenotypes in adolescent Greeks. *Eur J Hum Genet* **15**: 88-93.

Nazarov IB, Woods DR, Montgomery HE, Shneirder OV, Kazakov VI, Tomilin NV, et al. (2001) The angiotensin converting enzyme I/D polymorphism in Russian athletes. *Eur J Hum Genet.* 9:797-801.

Niemi A.K. & Majamaa K. (2005) Mitochondrial DNA and ACTN3 genotypes in Finnish elite endurance and sprint athletes. *Eur J Hum Genet* 13, 965-969.

Norman B., Esbjornsson M., Rundqvist H., Osterlund T., von Walden F., & Tesch P.A. (2009) Strength, power, fiber types, and mRNA expression in trained men and women with different ACTN3 R577X genotypes. *J Appl Physiol* 106, 959-965.

North K.N., Beggs A.H. (1996) Deficiency of a skeletal muscle isoform of alpha-actinin (alpha-actinin-3) in merosin-positive congenital muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 6: 229-235

North K.N., Yang N., Wattanasirichaigoon D., Mills M., Easteal S., Beggs A.H. (1999) A common nonsense mutation results in alpha-actinin-3 deficiency in the general population. *Nat Genet* 21: 353-354

Ogura Y., Naito H., Kakigi R., Akema T., Sugiura T., Katamoto S., Aoki J. (2009) Different adaptations of alpha-actinin isoforms to exercise training in rat skeletal muscles. *Acta Physiol (Oxf)* 196(3): 341-349

Papadimitriou, I.D., Papadopoulos C., Kouvatsi A. and Triantaphyllidis C. (2008) The ACE I/D polymorphism in elite Greek track and field athletes. *Journal of Sports and Medicine in Physical Fitness*, 49 (4): 459-463.

Paparini, A., Ripani, A.M., Giordano, G.D., et al (2007) ACTN3 Genotyping by Real-Time PCR in the Italian Population and Athletes. *Med. Sci. Sports Exerc.* 39: 810-815.

Pérusse, L., Rankinen, T., Hagberg, J.M., Loos, R.J.F., et al (2013) Advances in Exercise, Fitness, and Performance Genomics in 2012. *Med Sci Sports Exerc.* 45(15): 824-831.

Pescatello, L.S., Kostek, M.A., Gordisch-Dressman, H., Thompson, P.D., et al (2006) ACE ID genotype and the muscle strength and size response to unilateral resistance training. *Med. Sci. Sports Exerc.* 38: 1074-1081.

Pimenta E.M. (2012) Polimorfismos Genéticos para a Alfa Actinina 3 Y Respuestas Fisiologicas en Atletas Del futbol. Tese de Doutorado apresentado na Universidad de Leon, Departamento de Ciências Biomédicas. Espanha.

Prior S.J., Roth, S.M., Wang, X., Kammerer, C., Miljkovic-Gacic I., Bunker, C.H., Wheeler, V.W., Patrick, A.L. & Zmuda, J.M. (2007) Genetic and environmental influences on skeletal muscle phenotypes as a function of age and sex in large, multigenerational families of African heritage. *J Appl Physiol* 103, 1121-1127.

Puthuchery, Z. et al. (2011) The ACE gene and human performance: 12 years on. *Sports Med.* 41(6) 433 – 448.

Puthuchery, Z., Skipworth, J.R.A., Rawal, J., et al (2011) Genetic Influences in Sport and Physical Performance. *Sports Med* 41 (10): 845-859.

Rankinen, T. et al. (2000) No association between the angiotensin-converting enzyme ID polymorphism and elite endurance athlete status. *J Appl Physiol.* 88 (5), 1571- 1575.

Rankinen T., Perusse L., Rauramaa R., Rivera M.A., Wolfarth B., Bouchard C. (2001) The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes. *Med Sci Sports Exerc* 33: 855-867.

Rankinen T., Roth S.M., Bray M.S., Loos R., Perusse L., Wolfarth B., Hagberg J.M., Bouchard C. (2010) Advances in exercise, fitness, and performance genomics. *Med Sci Sports Exerc* 42: 835-846.

Rebbeck T.R., Spitz M., Wu X. (2004) Assessing the function of genetic variants in candidate gene association studies. *Nat Rev Genet* 5: 589-597.

RIGAT, B. et al. (1990) An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest*, 86 (4), 1343 – 1346.

Rodriguez-Romo, G., Ruiz, J.R., Santiago, C., Fiuza-Luces, C., Gonzalez-Freire, M., Gomez-Gallego, F., Mórán, M. and Lucia, A. (2010). Does the ACE I/D polymorphism, alone or in combination with the ACTN3 R577X polymorphism, influence muscle power phenotypes in young, non-athletic adults? *Eur J Appl Physiol.* 110: 1099-1106.

Rodriguez-Romo, G., Yvert, T., Diego, A., Santiago, C., Durana, A.L.D., Carratalá, V., Garatachea, N and Lucia, A. (2013). No association between ACTN3 R577X polymorphism and elite judo athletic status. *Int. J. Sports Physiol. Perform.* 8: 579-581.

Roth, S.M., Walsh, S., Liu, D., Metter, E.J., Ferrucci, L. & Hurley, B.F. (2008). The ACTN3 R577X nonsense allele is under-represented in elite-level strength athletes. *Eur. J.Hum Genet.* 16: 391–394.

Roth, S.M., Rankinen, T., Hagberg, J.M., Loos, R.J.F., et al (2012) Advances in Exercise, Fitness, and Performance Genomics in 2011. *Med Sci Sports Exerc.* 44(5): 809-817.

Ruiz JR, Gómez-Gallego F, Santiago C, González-Freire M, Verde Z, Foster C, et al. (2009) Is there an optimum *endurance* polygenic profile? *J Physiol.* 587:1527-1534.

Ruiz J.R., Fernández Del Valle M., Verde Z., Díez-Vega I., Santiago C., Yvert T., Rodríguez-Romo G., Gómez-Gallego F., Molina J.J., Lucia A. (2010). ACTN3 r577x polymorphism does not influence explosive leg muscle power in elite volleyball players. *Scand J Med Sci Sports* 2010; JUN 18. DOI: 10.1111/j.1600-0838.2010.01134.x.

Ruiz JR, Arteta D, Buxens A, Artieda M, Gómez-Gallego F, Santiago C, et al. (2010) Can we identify a power oriented polygenic profile? *J Appl Physiol.* 108:561-566.

Santiago, C.; González-Freire, M.; Serratos, L.; Morate, F. J.; Meyer, T.; Gómez-Gallego, F.; Lucia, A. (2008) ACTN3 genotype in professional soccer players. *Br J Sports Med* 42(1): 71-73.

Santiago C, Rodríguez-Romo G, Gómez-Gallego F, González-Freire M, Yvert T, Verde Z, et al. (2010) Is there an association between ACTN3 R577X polymorphism and muscle power phenotypes in young, non-athletic adults? *Scand J Med Sci Sports* 20:771-778

Santiago C, Ruiz JR, Muniesa CA, González-Freire M, Gómez-Gallego F, Lucía A. (2010) Does the polygenic profile determine the potential for becoming a world-class athlete? Insights from the sport of rowing. *Scand J Med Sci Sports.* 20:188-194.

Saunders C.J., September A.V., Xenophontos S.L., Cariolou M.A., Anastassiades L.C., Noakes T.D., Collins M.(2007) Association of the ACTN3 gene

R577X polymorphism with endurance performance in ironman triathlons. *Ann. Hum. Gene.* 71, 777–781

Scott W., Stevens J., Binder-Macleod SA. (2001) Human skeletal muscle fiber type classifications. *Phys Ther* 81, 1810-1816.

Scott, R. A. et al. (2005) No association between Angiotensin Converting Enzyme (ACE) gene variation and endurance athlete status in Kenyans. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 141 (2), 169-175.

Scott RA, Irving R, Irwin L, Morrison E, Charlton V, Augustin K, et al. (2010) ACTN3 and ACE genotypes in elite Jamaican and US sprinters. *Med Sci Sports Exerc.* 42:107–112.

Shanmugam, V.; Sell, K. W.; Saha, B. K. (1993) Mistyping ACE heterozygotes. *PCR Methods Appl*, 3 (2): 120-121.

Shenoy, S. et al. (2010) Association of Angiotensin Converting Enzyme gene Polymorphism and Indian Army Triathletes Performance. *Asian J Sports Med.* 1 (3): 143-50.

Simoneau, J.A. and Bouchard C. (1995) Genetic determinism of fiber type proportion in human skeletal muscle. *FASEB J.* 9: 1091-5.

Sonna, L.A., Sharp, M.A., Knapik, J.J., Cullivan, M., Angel, K.C., Patton, J.F. and Lilly, C.M. (2001) Angiotensin-converting enzyme genotype and physical performance during US Army basic training. *J. Appl. Physiol.* 91: 1355-1363.

Stewart, CE & Rittweger, J. (2006) Adaptive processes in skeletal muscle: molecular regulators and genetic influences. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 6, 73-86.

Thomis M., Van Leemputte M., Maes HH., Blimkie CJ., Claessens A., Marchal G., Willems E., Vlietinck R. & Beunen GP. (1997) Multivariate genetic analysis of maximal isometric muscle force at different elbow angles. *J Appl Physiol* 82, 959-967.

Thomis M., Beunen G., Maes H., Blimkie C., Van Leemputte M., Claessens A., Marchal G., Willems E., Vlietinck R. (1998) Strength training: importance of genetic factors. *Med Sci Sports Exerc* 30, 724-731.

Thomis M., Huygens W., Heuninckx S., Chagnon M., Maes H., Claessens A., Vlietinck R., Bouchard C., Beunen G. (2004) Exploration of myostatin polymorphisms and the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion genotype in responses of human muscle to strength training. *Eur J Appl Physiol* 92: 267-274.

Thompson, W.R. and Binder-Macleod, S.A. (2006) Association of genetic factors with selected measures of physical performance. *Physical Therapy*, Glenside 86: 585-591.

Thompson, J. et al. (2007) Angiotensin-converting enzyme genotype and successful ascent to extreme high altitude. *High Alt Med Biol.* 8(4), 278-285.

Tiainen K., Sipilä, S., Kauppinen, M., Kaprio, J & Rantanen, T. (2009) Genetic and environmental effects on isometric muscle strength and leg extensor power followed up for three years among older female twins. *J Appl Physiol* 106, 1604-1610.

Tobina, T. et al. (2010) Association between the angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and endurance running speed in Japanese runners. *The Journal of Physiological Sciences.* 60 (5), 325-330.

Tucker, R., Concejero-Santos, J. and Collins, M. (2013) The genetics basis for elite running performance. *Br. J. Sports Med* 47: 545 – 549.

Tsianos, G., Sanders, J., Dhamrait, S., Humphries, S., Grant, S., Montgomery, H. (2004). The ACE gene insertion/deletion polymorphism and elite endurance swimming. *Eur. J. Appl. Physiol.* 92:360–62

Vincent B., De Bock K., Ramaekers M., Van den Eede E., Van Leemputte M., Hespel P., Thomis M.A. (2007) ACTN3 (R577X) genotype is associated with fiber type distribution. *Physiol Geno* 32: 58–63.

Vincent B., Windelinckx A., Nielens H., Ramaekers M., Van Leemputte M., Hespel P., Thomis M.A. (2010) Protective role of alpha-actinin-3 in the response to an acute eccentric exercise bout. *J Appl Physiol* 109(2), 564-573.

Zhao, B., Moolchala, S.M., Tham, S., Lu, J., Chia, M., Byrne, C., Hu, Q and Lee, L.K.H. (2003) Relationship between angiotensin-converting enzyme ID polymorphism and $\text{VO}_{2\text{max}}$ of Chinese males. *Life Sciences.* 73: 2625-2630.

Zempo H, Tanabe K, Murakami H, Lemitsu M, Maeda S, Kuno S. (2010) ACTN3 polymorphism affects thigh muscle area. *Int J Sports Med.* 31:138–142.

Zhang B, Tanaka H, Shono N, Miura S, Kiyonaga A, Shindo M, et al. (2003) The I allele of the angiotensin-converting enzyme gene is associated with an increased percentage of slowtwitch type I fibres in human skeletal muscle. *Clin Genet.* 63:139–144.

Zilberman – Schapira, G., Chen, J. and Gerstein, M. On Sports and Genes. Recent Patents on DNA & Gene Sequences 6, 000 – 000.

Walsh S., Liu D., Metter E.J., Ferrucci L., Roth S.M. (2008) ACTN3 genotype is associated with muscle phenotypes in women across the adult age span. *Jour. Appl. Physiol.* 105: 1486–1491.

Wang, G., Mikami, E., Chiu, L., et al (2013) Association Analysis os ACE and ACTN3 in elite Caucasian and East Asian Swimmers. *Med. Sci. Sports Exerc.* 45 (5): 892 – 900.

Williams, A. G. et al. (2000) The ACE gene and muscle performance. *Nature.* 403 (6770) 614.

Williams AG, Folland JP. (2008) Similarity of polygenic profiles limits the potential for elite human physical *performance*. *J Physiol.* 586:113-121.

Wolfarth B., Bray M.S., Hagberg J.M., Perusse L., Rauramaa R., Rivera M.A., Roth S.M., Rankinen T., Bouchard C. (2005) The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2004 update. *Med Sci Sports Exerc* 37, 881-903.

Woods D, Hickman M, Jamshidi Y, Brull D, Vassiliou V, Jones A, et al.(2001) Elite swimmers and the D allele of the ACE I/D polymorphism. *Hum Genet.* 108:230–232.

Woods, D. (2009) Angiotensin-converting enzyme, renin-angiotensin system and human performance. *Medicine and Sport Science*, 54: 72-87.

Yang, N., MacArthur, D.G., Gulbin, J.P., Hahn, A.G., Beggs, A.H., Easteal, S., North, K. (2003) ACTN3 genotype is associated with human elite athletic performance. *Am J Hum Genet* 73: 627-631.

Yang, N., MacArthur, D.G., Wolde, B., Onywera, V.O., et al (2007) The ACTN3 R577X Polymorphism in East and West African Athletes. *Med. Sci. Sports Exerc.* 39(11): 1985-1988.

ANEXOS



LAPECE – LABORATORIO DE PESQUISAS E ESTUDOS EM CIÊNCIAS DO ESPORTE

Departamento de Ciências do Esporte

CEFE

FICHA DE AVALIAÇÃO

Data:

MODALIDADE:

Dados Pessoais

CÓDIGO BIOBANCO: DES BIO

ACTN3 N=

<i>Nome do Avaliado:</i>	
<i>Data de Nascimento:</i>	<i>Gênero: M() / F()</i>
<i>Origem:</i>	<i>Tempo de Prática:</i>
<i>Posição/Prova:</i>	<i>Categoria:</i>
<i>Estatura:</i>	<i>Tronco-encefálica:</i>
<i>Peso:</i>	<i>Envergadura:</i>

COMPOSIÇÃO CORPORAL

Plestimografia - Bod Pod

<i>%Massa Magra:</i>	<i>%Massa Gorda:</i>
<i>Volume corporal:</i>	<i>Densidade corporal:</i>

Bioimpedância - Xitron

<i>Líquido Interno:</i>	<i>Líquido Externo:</i>	<i>Líquido Total:</i>
-------------------------	-------------------------	-----------------------

TESTES MOTORES

Potência de Membros Inferiores

<i>SJ</i>	<i>Altura:</i>	<i>Potência:</i>
<i>SCM</i>	<i>Altura:</i>	<i>Potência:</i>
<i>SCML</i>	<i>Altura:</i>	<i>Potência:</i>

Velocidade

	<i>Tempo</i> (s)	<i>Velocidade</i> (m/s ²)		<i>Tempo</i> (s)	<i>Velocidade</i> (m/s ²)	<i>Tempo Total (s)</i>
1.10m			30m			
2.10m			30m			

CAPACIDADE CARDIORRESPIRATÓRIA**Ergoespiometria (K4b²)**

[] esteira; [] bicicleta.

<i>VO₂ Pico:</i>	<i>Tempo de Teste:</i>	<i>Velocidade atingida:</i>
<i>FC Repouso:</i>	<i>FC Máx.:</i>	<i>FC Recuperação:</i>

**POTÊNCIA DE MEMBROS INFERIORES
SALTOS (SJ, SCM E SCML)**

SALTOS	CONTATO (s)	VOÔ (s)	TOTAL (s)	ALTURA (cm)	POTÊNCIA (W)
SJ					
SCM					
SCML					

**Coleta de Sangue: Tubo coletor número (CÓDIGO BIOBANCO: DES BIO ACTN3
N=____)**

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Titulo da pesquisa:

“Associação dos polimorfismos da alfa-actinina 3 (ACTN3) e enzima conversora da angiotensina (ECA) com indicadores do desempenho em atletas”

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) a participar da pesquisa “Associação dos polimorfismos da alfa-actinina 3 (ACTN3) e enzima conversora da angiotensina (ECA) com indicadores do desempenho em atletas”, realizada no “Centro de Educação Física e Esporte, Laboratório de Pesquisa em Ciências do Esporte”.

O objetivo da pesquisa é “Analisar a distribuição do gene da alfa-actinina 3 (XX, RX e RR) em atletas jovens de diferentes modalidades”.

A sua participação é muito importante e ela se dará da seguinte forma: será coletada uma amostra sanguínea de 10ml para analisar o DNA genético e identificar um gene da fibra de contração muscular importante em atletas, e esse material será armazenado em um banco de material biológico (BIOBANCO), devidamente registrado sob minha responsabilidade, conforme a RESOLUÇÃO CEPE/CA nº 152/2011 que estabelece o regulamento sobre o armazenamento de material biológico humano obtido em pesquisa e o seu uso, RESOLUÇÃO CNS nº 196/96 e complementares em especial a RESOLUÇÃO nº 441/2011, bem com a PORTARIA do Ministério da Saúde e RDCs da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA.

CASO VOCÊ AUTORIZAR, seu material biológico será armazenado (BIOBANCO) e após ser utilizado, analisado e classificado no presente estudo, este BIOBANCO poderá ser utilizado em outras pesquisas de CARACTERIZAÇÃO DE GENOTIPAGEM E ESTUDOS GENÉTICOS DE ASSOCIAÇÃO COM A PERFORMANCE ESPORTIVA.

As amostras sanguíneas serão armazenadas em um BIOBANCO, no Laboratório de Genética do Departamento de Biologia, da Universidade Estadual de Londrina, onde não será permitido o acesso a esses dados por terceiros, como por exemplo: empregadores, empresas seguradoras e outras instituições de ensino.

Você também fará uma bateria de testes físicos como: um teste de composição corporal para ver o quanto de gordura corporal, massa muscular magra e água você tem no corpo; um teste de esforço máximo na esteira até a exaustão; um teste de velocidade de 30 m; um teste de potência de pernas onde serão realizados três tipos de saltos, e um teste de potência anaeróbia (intenso e máximo) em bicicleta ergométrica.

Os benefícios esperados são avaliação da sua condição física fornecendo informações em relação à saúde; avaliação da sua condição física para melhor aproveitamento dos treinamentos, consequentemente melhores resultados em competições e identificação genética das características de fibras musculares, que poderão levar ao melhor direcionamento do treinamento e da modalidade.

Os riscos que poderão porventura acontecer são: Em função da realização de um teste de esforço máximo poderá haver desconforto cardiorrespiratório e muscular

durante e logo após o teste. Poderá haver ocorrência de dores musculares após os demais testes físicos.

Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa caso não autorize o BIOBANCO, e suas informações serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade. Além disso, no caso da autorização de armazenamento de material biológico, quando da sua solicitação para a retirada dos seus materiais biológicos do BIOBANCO, isso será realizado imediatamente.

Informamos que o(a) senhor(a) não pagará e nem será remunerado por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação na pesquisa.

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode nos contatar:

Prof. Larissa Bobroff Daros

Telefone: (9) (041) (43) 9998-1795 ou (43) 3339-6516

email: lbдарos99@gmail.com

ou

CEP/UEL - Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Kock, nº 60, ou no telefone 33712490. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Londrina, ____ de _____ de 2012.

Prof. Larissa Bobroff Daros

Pesquisador Responsável

RG: 4.732.735-0/SSP-PR

_____ (nome por extenso do sujeito de pesquisa),
tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar voluntariamente da pesquisa descrita acima.

Assinatura do responsável (ou impressão dactiloscópica): _____

Assinatura do menor (ou impressão dactiloscópica): _____

Data: _____

_____ (nome por extenso do sujeito de pesquisa),
tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da criação de BIOBANCO para futuras pesquisas, concordo com o armazenamento de meu material biológico, e que o mesmo seja utilizado em futuras pesquisas.

Assinatura do responsável (ou impressão dactiloscópica): _____

Assinatura do menor (ou impressão dactiloscópica): _____

Data: _____